

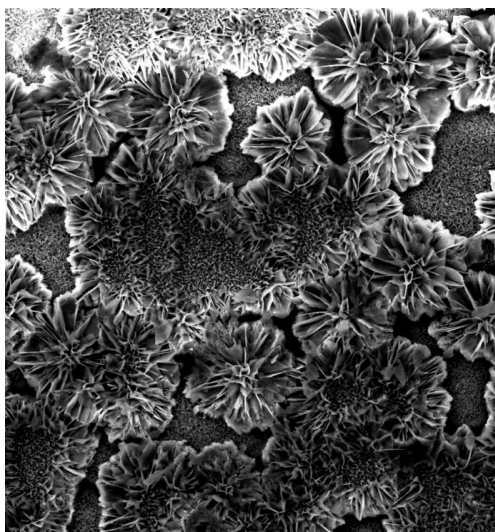


UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA
BARCELONATECH
Escola d'Enginyeria de Barcelona Est

TREBALL FI DE GRAU

Grau en Enginyeria Biomèdica

**TRACTAMENTS D'ELECTRODEPOSICIÓ DE FOSFAT DE
CALCI SOBRE SUPERFÍCIE DE TITANI PER APLICACIONS
BIOMÈDIQUES**



Memòria i Annexos

| | |
|----------------------|-----------------------|
| Autor: | Joan March Seguí |
| Director: | Daniel Rodríguez Rius |
| Convocatòria: | Gener 2019 |



Resum

Aquest projecte, té com a finalitat millorar la tècnica d'electrodeposició de fosfat de calci sobre discs de Titani pur. En ell s'han realitzat assajos de electrodeposició en diferents condicions, les quals han estat observades al microscopi electrònic per veure la seva microestructura. També mitjançant difracció de raigs X s'han trobat diferents fases estequiomètriques. Han estat realitzats estudis d'alliberament de ions de Calci al medi. S'han realitzat assajos de tracció sobre la capa ceràmica per conèixer les propietats mecàniques de les diferents mostres estudiades. Finalment amb les mostres obtingudes s'han realitzat cultius cel·lulars per comprovar la seva compatibilitat amb el material.

Resumen

Este proyecto, tiene como finalidad mejorar la técnica de electrodeposición de fosfato de calcio sobre discos de Titanio Puro. En el se han realizado ensayos de electrodeposición en diferentes condiciones, las cuales han sido observadas posteriormente en el microscopio electrónico para ver su microestructura. También mediante difracción de rayos X se han encontrado diferentes fases estequiométricas. Han sido realizados estudios de libramientos de iones de Calcio en el medio. Se han realizado ensayos de tracción sobre la capa cerámica para conocer las propiedades mecánicas de las diferentes muestras estudiadas. Finalmente con las muestras obtenidas se han realizado cultivos celulares para comprobar su compatibilidad con el material.

Abstract

This project, aims to improve the electrodeposition technique of calcium phosphate on pure Titanium discs. In it electrodeposition tests have been carried out under different conditions, which have been observed later in the electron microscope to see their microscopy. Also, by diffraction of X-rays, different stoichiometric stages have been found. Release of Calcium ions studies have been conducted in the medium. Traction tests on the ceramic layer have been performed to know the mechanical properties of the different samples studied. Finally, with the samples obtained, cell cultures have been performed to check their compatibility with the material.



Agraïments

En primer lloc vull donar les gràcies al Doctor Daniel Rodríguez per donar-me l'oportunitat de realitzar aquest projecte i entrar en el món de la investigació. És d'agrair el suport que m'ha donat en tot moment i, la seva plena disposició per ajudar-me amb el projecte de manera incondicional.

També donar les gràcies al grup d'investigació BBT per brindar-me els recursos necessaris, ja que sense ells tot això no hagués estat possible.

M'agradaria agrair especialment a tots els companys que durant els anys de la carrera m'han donat el seu suport i ens hem ajudat mútuament per tirar endavant.

Per últim vull donar les gràcies als meus pares per el seva ajuda incondicional i per donar-me l'oportunitat de venir a viure a Barcelona per poder continuar amb els meus estudis.



Glossari

Fosfat de Calci: CaP

Fosfat octacàlcic: OCP

Fosfat dicàlcic Anhídrid: DCPA

Fosfat dicàlcic dihidratat: DCPD

Hidroxiapatita: HA

Microscopi electrònic de rastreig: SEM

Índex

| | |
|--|----|
| Resum | 2 |
| Resumen | 3 |
| Abstract | 4 |
| Agraïments | 6 |
| Glossari | 8 |
| 1. Prefaci | 14 |
| 1.1. Motivació | 14 |
| 1.2. Requeriments previs..... | 14 |
| 2. Introducció..... | 16 |
| 3. Fonaments teòrics | 17 |
| 3.1. L'os humà..... | 17 |
| 3.1.1. Composició de l'os..... | 17 |
| 3.1.2. Cèl·lules de l'os | 17 |
| 3.2. Biomaterials..... | 18 |
| 3.2.1. La història dels biomaterials | 18 |
| 3.2.2. Ús dels biomaterials en medicina..... | 18 |
| 3.3. Bioceràmiques | 19 |
| 3.3.1. Classificació..... | 19 |
| 3.3.2. Ceràmiques bioactives..... | 20 |



| | | |
|--------|---|----|
| 3.4. | Fosfat càlcic | 20 |
| 3.4.1. | Fases del Fosfat Càlcic | 21 |
| 4. | Materials i mètodes..... | 23 |
| 4.1. | Preparació de mostres..... | 23 |
| 4.1.1. | Característiques de les mostres..... | 23 |
| 4.1.2. | Fixació de la mostra | 23 |
| 4.1.3. | Polit..... | 23 |
| 4.1.4. | Extracció i neteja de la mostra | 25 |
| 4.2. | Electrodeposició de Fosfat de Calci | 25 |
| 4.3. | Variables | 26 |
| 4.3.1. | Temperatura | 26 |
| 4.3.2. | Temps | 27 |
| 4.3.3. | pH..... | 27 |
| 4.3.4. | Pre-tractament de la superfície | 27 |
| 4.3.5. | Concentració..... | 27 |
| 4.3.6. | Rati Ca/P | 27 |
| 4.3.7. | Tractament a pressió i temperatura..... | 27 |
| 4.4. | Sembrat cel·lular..... | 27 |
| | Dia 1..... | 28 |
| | Dia 3..... | 29 |
| | Dia 4..... | 29 |
| 4.5. | Alliberament de Calci..... | 30 |

| | | |
|--------|---|----|
| 4.6. | Assaig de tracció | 31 |
| 4.7. | Caracterització morfològica..... | 31 |
| 4.8. | Determinació de la microestructura dels CaP electrodepositats | 32 |
| 5. | Resultats i discussió | 32 |
| 5.1. | Resultats SEM | 32 |
| 5.1.1. | Resultats electrodeposició | 32 |
| 5.1.2. | Discussió electrodeposició..... | 46 |
| 5.1.3. | Resultats sembrat cel·lular | 47 |
| | 24h | 48 |
| | 72 h | 53 |
| 5.1.4. | Discussió sembrat cel·lular | 57 |
| 5.2. | Difracció de raigs X | 58 |
| 5.2.1. | Resultats difracció de raigs X..... | 58 |
| 5.2.2. | Discussió difracció de raigs X..... | 72 |
| 5.3. | Alliberament de Calci..... | 73 |
| 5.3.1. | Resultats alliberament de Calci | 73 |
| 5.3.2. | Discussió alliberament de Calci | 74 |
| 5.4. | Assaig de tracció | 78 |
| 5.4.1. | Resultats assaig de tracció..... | 78 |
| 5.4.2. | Discussió assaig de tracció..... | 78 |
| 6. | Conclusions..... | 79 |
| 7. | Costs econòmics i mediambientals | 81 |

| | | |
|------|----------------------------|----|
| 7.1. | Costs econòmics | 81 |
| 7.2. | Costs mediambientals | 83 |
| 8. | Bibliografia..... | 84 |



1. Prefaci

1.1. Motivació

Després de cursar el grau en enginyeria biomèdica, es toquen moltes branques de coneixement. Des del principi, la que em va cridar més l'atenció va ser la dels biomaterials. Vaig parlar amb el meu tutor del TFG, hi hem va proposar aquest projecte, ho vaig veure com una oportunitat de capficar-me en aquest tema i assolir molts coneixements. A més el sector dels implants és el futur de la medicina i poder posar el meu petit gra d'arena per a millorar la vida de molta gent, han estat decisius a l'hora de fer aquest projecte.

1.2. Requeriments previs

Per poder entendre aquest treball, s'han de tenir uns coneixements bàsics de materials, de química, així com de circuits elèctrics.



2. Introducció

Els biomaterials, són aquells que s'empren amb l'objectiu de millorar la vida dels éssers humans contrarestant lesions, o bé substituint o modificant la seva anatomia o un procés fisiològic.

Els biomaterials metàl·lics posseeixen bones propietats mecàniques i alta resistència a la corrosió [1]. És per això que tenen grans avantatges en les aplicacions mèdiques. Un exemple és el Ti6Al4V que actualment s'usa per formar una capa de nanòmetres d'espessor que al ser exposada a l'ambient forma Òxid de Titani (TiO_2) que és un material molt estable termodinàmicament. Aquesta capa té un problema, no és molt adherent al teixit ossi, i això fa que al sotmetre-la a un desgast constant, és despregui i això afecti a la seva biocompatibilitat [2].

El Fosfat de Calci és el nom que s'emptra per anomenar la família de minerals que tenen cations de Calci amb anions de fòsfor. Aquest mineral, té molta importància en el camp dels biomaterials ja que forma el 60% de la composició dels ossos així com un 90% de l'esmalt dental [3].

El Fosfat de Calci té una gran importància a nivell biomèdic, ja que s'ha demostrat que recobrint les pròtesis metàl·liques amb aquest material s'accelera la fixació a les fases inicials de la implantació, així es pot eliminar el problema antes comentat de la falta d'adherència del Titani. Hi ha hagut molta investigació sobre els diferents mètodes de fixació del recobriment, però molts han estat descartats (spray, pintura, polvorització,...). Però els que pareix que donen un millor resultats són els tractaments electroquímics, ja que amb aquest mètode es poden recobrir superfícies irregulars (les quals acostumen a tenir les pròtesis) [4].

Aquest Treball Final de Grau (TFG) té com objectiu l'estudi de l'electrodeposició d'aquest element ceràmic per així poder acotar els diferents paràmetres d'aquest fenomen. És a dir crear una guia per poder fer aquest tractament i obtindre els resultats esperats. Després dels experiments d'electrodeposició, les mostres escollides seran estudiades. Posant a prova la seva compatibilitat amb les cèl·lules òssies amb un sembrat cel·lular. També és realitzarà un estudi sobre el Calci alliberat per aquestes. Per així poder tenir una estimació dels nivells d'aquest material que alliberaria al medi intern després d'una possible implantació.

I finalment és mesurarà l'adherència de la capa de CaP sobre el titani mitjançant assajos de tensió.

3. Fonaments teòrics

3.1. L'os humà

L'objectiu d'aquest treball és la creació d'una capa de CaP sobre la superfície de titani per a la millor compatibilitat amb l'os humà, per això cal conèixer-lo amb profunditat.

L'os és un òrgan dur i resistent que forma part de l'endosquelet dels vertebrats. Està compost principalment per teixit ossi, un tipus especialitzat de teixit connectiu constituït per cèl·lules, i components extracel·lulars calcificats. Els ossos també posseeixen cobertes de teixit connectiu (periosti) i cartílag, vasos, nervis, i alguns contenen teixit hematopoyètic i adipós (medul·la òssia) [3].

Les seves tres funcions principals són:

- Mecànica o de suport; permet la inserció muscular i per tant possibilita la locomoció.
- Protecció d'òrgans vitals; com poden ser el cervell, el cor o els pulmons i de la mateixa manera la medul·la òssia.
- Metabòlica; permet emmagatzemar diferents ions, principalment calci i fòsfor.

3.1.1. Composició de l'os

Els ossos estan formats per teixit connectiu mineralitzat format per una part no cel·lular anomenada material osteoide, i una part cel·lular.

El material osteoide presenta dues fases, una proteica i una mineral. La part proteica i la cel·lular estan formades majoritàriament per col·lagen, mentre que la mineral està formada per cristalls d'hidroxiapatita intercalats amb les fibres de col·lagen [8].

3.1.2. Cèl·lules de l'os

Trobem dos tipus principals de cèl·lules òssies:

- **Osteoblasts:** Són les cèl·lules encarregades de sintetitzar la matriu òssia, per la qual cosa estan directament involucrats en el creixement dels ossos. La seva funció principal és el manteniment, creixement i reparació dels ossos.
- **Osteoclasts:** Són cèl·lules multinucleades, les quals són mòbils. Són els principals responsables de la reabsorció de la matriu òssia dels ossos vells. Formen túnels profunds a la superfície de l'os compacte, les quals són envaïdes més tard per cèl·lules endotelials.
- **Osteocits:** són les cèl·lules principals del teixit ossi, representen el 95% del total de cèl·lules d'aquest teixit. Cada un es troba situat en una llacuna dins la substància intercel·lular mineralitzada de l'os.

3.2. Biomaterials

3.2.1. La història dels biomaterials

En el passat els metges disposaven de pocs recursos per enfrontar-se a les dolències o malalties dels seus pacients i sovint recorrien a amputacions o extirpacions dels òrgans afectats. Aquestes pràctiques sovint eren efectives però deixaven als pacients amb mancances que afectaven a la seva qualitat de vida. Però en algunes societats del món antic, com l'egípcia, les grecollatines, o els inques, varen emprar materials per usos distintius dins el cos humà.

Els primers materials usats per aplicacions mèdiques, foren d'origen natural com la fusta, el vidre o el marfil. Aquesta primera generació només substituïen una part del cos i es deixava de banda la interacció amb ell (cames de fusta, ulls de vidre, dents d'or, etc.). Va ser després del segle XIX quan la situació va canviar completament gràcies a l'aparició d'antisèptics, antibiòtics, vacunes i pràctiques higièniques als hospitals. Passada la Segona Guerra Mundial es van començar a utilitzar polímers en medicina com a lents de contacte y metalls en forma de claus com a elements de fixació en fractures. Més tard varen aparèixer els materials bioactius, biodegradables o reabsorbibles, és a dir, aquells que tenien integració en el medi fisiològic, o que induïen a una resposta adequada. Exemples d'aquests materials són l'hidroxiapatita, els fosfats tricàlcics, els biovidres i les vitroceràmiques.

3.2.2. Ús dels biomaterials en medicina

Definim un biomaterial com a un material dissenyat per a interaccionar amb sistemes biològics per a avaluar, tractar, augmentar o reemplaçar qualsevol teixit o òrgan o funció del cos. També ho podem definir com a un material sintètic o natural emprat per a substituir part de un sistema viu

o bé per a funcionar en contacte íntim amb el teixit viu. Aquests materials inclouen els polímers, els metalls i les ceràmiques i també la combinació d'ells, els quals es coneixen com a materials compostos [22].

Les aplicacions dels biomaterials, van des de aplicacions oftalmològiques, dentals i ortopèdiques, fins a aplicacions més especialitzades a l'àrea cardiovascular o del sistema nerviós. Gràcies a ells avui en dia moltes parts del cos humà poden ser substituïdes.

El desenvolupament de materials amb aplicacions biomèdiques es un procés llarg, ja que requereix la síntesis dels materials, la seva transformació amb la geometria adequada (tubs, pel·lícules, etc.) i finalment, nombrosos assaigs físics, químics i mecànics que garanteixin la seva qualitat. [5]

3.3. Bioceràmiques

3.3.1. Classificació

Les bioceràmiques ocupen un lloc important dintre del món dels biomaterials pel que fa a la substitució de teixits durs. De l'ampli ventall de possibilitats es podrien classificar segons el tipus de resposta que indueixen al teixit que hi entra en contacte.

- Ceràmiques quasi inerts: Creen una càpsula fibrosa entre el teixit circumdant i la superfície de l'implant. Un exemple d'aquest grup és l'alúmina (Al_2O_3), que va ser la primera bioceràmica gràcies a les seves bones propietats mecàniques i resistència al desgast.
- Ceràmiques bioactives: aquestes generen una resposta biològica del teixit que l'envolta creant un enllaç entre el material i el teixit ossi. En aquest grup existeixen materials molt variats com els vidres bioactius, les ceràmiques basades en hidroxiapatita i altres fosfats de calci.
- Ceràmiques reabsorbibles: Un cop han estat introduïdes al cos, poc a poc van sent absorbides o degradades per l'organisme. Això, possibilita que en el seu lloc es vagi generant teixit ossi. Com a inconvenient, a vegades les velocitats de degradació i de creixement de l'os són massa diferents, donant lloc a problemes. Com exemple hi ha el sulfat de calci o alguns fosfats de calci.

3.3.2. Ceràmiques bioactives

Com ja s'ha comentat són les ceràmiques capaces de generar un enllaç amb el teixit ossi, sense formar cap capa fibrosa.

Al principi dels anys 70, Hench va desenvolupar el Bioglass®, que contenia principalment SiO_2 , Na_2O , CaO i P_2O_5 [23]. Es va demostrar que era capaç de generar un enllaç tant en un teixit dur com en un de tou, però degut a les seves males propietats mecàniques va quedar relegat a situacions sense massa càrrega.

Al Japó, Kokubo va desenvolupar un material a partir de vitroceràmica més resistent, composta per cristalls d'apatita i wollastonita en una matriu vítria de SiO_2 , que van denominar vitroceràmica A/W. Posteriorment han aparegut més formulacions de vidres i ceràmiques bioactives [6].

3.4. Fosfat càlcic

El començament de l'aplicació del CaP com a substitut d'ossos o de l'empelt ossi es pot ubicar a l'any 1920 quan Albee va reportar que el fosfat tricàlcic emprat en un defecte ossi va provocar l'osteogènesi. Uns 50 anys més tard, és va reportar un mètode per a la preparació d'una ceràmica de CaP constituïda principalment per el mineral fluorapatita, començant a ser habitual el seu ús com a material d'implants dentals i en medicina.

L'any 1971 Hench va desenvolupar una nova ceràmica amb calci, fòsfor i silicat, la qual va anomenar Bioglass i va demostrar que aquesta s'enllaçava amb l'os químicament mitjançant una capa rica de CaP a la seva superfície [23]. Al 1973 es va reportar un altre mètode per a la preparació de ceràmiques de fosfat tricàlcic proposant-se el seu ús com a material per implants ossis.

Al 1974 es va publicar la primera aplicació dental del fosfat tricàlcic en efectes peridontals en gossos. En el propi any, Hubbard va presentar la preparació d'algunes ceràmiques de fosfat de Calci a partir de reactius químics i va explorar el seu possible ús com a implants ortopèdics. Alhora Roy i Linnehan van reportar un mètode de preparació d'una hidroxiapatita a partir de corals marins per transformació hidrotèrmica del carbonat de calci del coral. Aquest mètode de preparació difereix dels processos convencionals de fabricació de ceràmiques, ja que no són necessaris els passos de compactació i sinterització. El 1975 es va reportar l'ús d'una ceràmica porosa de fosfat de calci per reparar un defecte intraossi en gossos i va quedar demostrat que

aquest material no és tòxic, és biocompatible i no causa canvis hematològics significants pel que fa als nivells de calci i fòsfor. Aquest estudi també va demostrar histològicament el creixement d'un nou os dins dels porus i la reparació del defecte, indicant el gran potencial d'aquest material com una alternativa per al autoempelt ossi. El material usat en aquesta experiència va resultar ser una barreja de B-Ca i d'hidroxiapatita.

Les ceràmiques denses i poroses es fabriquen en general per compactació de pols (fosfat de calci, hidroxiapatita, etc.) a altes pressions, seguit d'un procés de sintetització a 1000- 1300 ° C. Presenten una microporositat variable segons el tipus i el procés emprat en la seva fabricació i la seva resistència mecànica arriba a ser en molts casos similar a la de l'os cortical.

A partir d'aquest moment es van intensificar els treballs de Jarcho i de Groot als Estats Units i col·laboradors a Europa sobre les potencialitats de les ceràmiques d'hidroxiapatita com a material d'implant o substitut d'os en estomatologia fins arribar a la introducció de productes comercials.

Actualment hi ha al mercat diversos productes de fosfat càlcic i vidres biològics, que tot i que han estat registrats i avalats per a la seva aplicació clínica, tots es troben en plena fase d'investigació-desenvolupament [5].

3.4.1. Fases del Fosfat Càlcic

El fosfat càlcic, es pot trobar en diferents fases estequiomètriques les quals ens poden donar unes diferents propietats aprofitables per a ús mèdic. Podem apreciar-les a les següent taula

| Ràtio molar de Ca/P | Nom |
|---------------------|---|
| 0'5 | MCPM (fosfat càlcic monobàsic monohidratat) |
| 1'0 | DCPA (difosfat càlcic anhidrid, monetita) |
| 1'0 | DCPD (fosfat càlcic dibàsic) |

| | |
|----------|---|
| | deshidratat, bruxita) |
| 1'33 | OCP (fosfat octacàlcic) |
| 1'5 | α -TCP (α -fosfat tricàlcic) |
| 1'5 | β -TCP (β -fosfat tricàlcic) |
| 1'2-2'2 | ACP (fosfat càlcic amorf) |
| 1'5-1'67 | CDHA (hidroxiapatita deficient en calci) |
| 1'67 | HA (hidroxiapatita) |
| 2'0 | TTCP (fosfat tetracàlcic) |

Taula 3.4.1. 1 Compostos de CaP depenent del rati de Ca i P [3]

Un cop presentades totes les fases que pot presentar el fosfat de calci procedirem a fer una petita descripció de les que tenen importància en aplicacions biomèdiques.

DCPA

S'anomena monetita i és la forma anhidrica del DCPD, per la qual cosa és més soluble que ell. Aquesta fase, es pot trobar en calcificacions no patològiques. S'usa com a ciments de CaP, font de calci i fòsfor en suplements nutricionals i com a component de dentífric.

DCPD

És la fase més fàcil de sintetitzar, a més de ser biocompatible, biodegradable, osteoconductiu i es pot transformar a DCPA per la qual cosa té molt de valor en aplicacions biomèdiques.

OCP

Té una gran importància biològica ja que és un dels components de les dents humanes i dels càlculs renals.

HA

Es pot trobar de forma natural com a un mineral format per apatita, Calci i Fòsfor. Té molta importància a nivell mèdic, ja que s'empra per omplir els ossos amputats o com a capa en els

implants. Es creu que pot promoure l'osteointegració [7]. Fins al 50% del pes de l'os és una forma modificada d'hidroxiapatita [8].

4. Materials i mètodes

4.1. Preparació de mostres

4.1.1. Característiques de les mostres

Les mostres que prepararem, seran discs de titani de un diàmetre de 10 mm i un gruix variable d'uns 2 mm.

4.1.2. Fixació de la mostra

Per poder polir la superfície dels discs de titani, han de ser prèviament fixats. Per això necessitem una embutidora. En aquesta màquina es col·loquen fins a un màxim de 5 discs amb la cara a tractar mirant cap a baix, i es recobreixen de baquelita en pols. Llavors la màquina escalfa la pols durant 5 minuts a una pressió de 15 N i després la deixa refredar durant 5 minuts més. El resultat obtingut és un cilindre de baquelita amb les 5 cares a tractar al descobert.



Imatge 4.1.2.1 Disc de Titani dins la baquelita sense polir

4.1.3. Polit

Per l'estudi a realitzar, les superfícies a tractar han d'estar completament polides, com un mirall. Per això s'han de realitzar una sèrie de processos, amb una polidora metal·logràfica automàtica a la qual té capacitat per a un màxim de sis provetes de baquelita. Hi ha que tenir en compte que el

nombre de provetes que es posen a la màquina ha de ser sempre parell i estar repartides de forma simètrica perquè el parell resistent sobre la màquina sigui igual.

Procediment:

1. Primer es passa un paper de polir de carbur de Silici (SiC) amb una mida de gra de P600 (aquest nombre ens informa sobre quantitat de grans que té el paper, com menor és el nombre, més gran és el gra, i el paper és més abrasiu) del per eliminar les impureses més grans durant 7 min, a una força de 10 N amb un raig continu de aigua. Aquest procés es pot realitzar dos cops per assegurar-se l'eficiència.
2. La següent tanda es realitza amb les mateixes condicions que l'anterior però amb un paper de P1200.
3. Per finalitzar es passen les provetes per paper P4000 amb les mateixes condicions del pas 1.
4. Un cop la mostra ha estat llimada, es passa al polit. Per això col·locarem un paper de vellut sobre el disc de la màquina metal·logràfica, durant tandes de 10 min, 10 N i sense raig d'aigua. Hi ha que anar mullant el paper amb una solució de pols d'alúmina de 1 μm contínuament. Aquest procés s'ha de repetir fins que la mostra tingui un acabat de mirall.
5. Si a l'acabar el procés s'observessin grans ratllades a la superfície s'hauria de tornar a començar tot el cicle.



Imatge 4.1.3.1 Disc de Titani dins la baquelita polit

4.1.4. Extracció i neteja de la mostra

Per a l'extracció de les mostres de la baquelita un cop polides s'han emprat dos mètodes diferents, tots ells amb els seus avantatges i els seus inconvenients.

1. **Extracció amb serra:** mètode més rudimentari en el qual es serren les vores del cilindre de baquelita i es van extraient els discs fent palanca amb una espàtula. Aquest mètode és lent però és més difícil que les mostres es ratllin.
2. **Extracció amb premsa hidràulica:** es col·loca la proveta envoltada en un drap sota la premsa i s'aplica pressió fins que es trenca. Aquest mètode és molt més ràpid que l'anterior, però és fàcil ratllar les mostres.

Per ser emprades per a l'electrodeposició netejarem prèviament les mostres per eliminar restes de baquelita i d'alúmina de la superfície. Per això netejarem amb aigua destil·lada i tovallons sense fibres. Després podem fer una darrera neteja amb etanol.

4.2. Electrodeposició de Fosfat de Calci

Un cop han estat preparades les mostres, és comença el procés de electrodeposició a la superfície dels discs de titani.

Per realitzar aquest procés, s'ha emprat un potenciostat PARSTAT 2273 amb el que s'ha dissenyat un pols de corrent amb les següents característiques

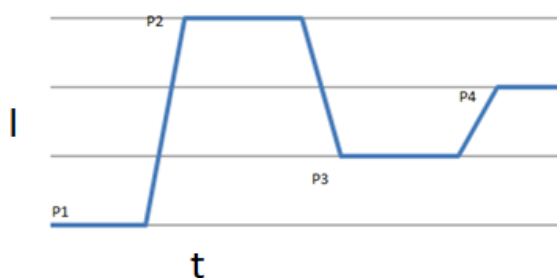


Figura 4.2.1. Esquema dels pols de corrent emprats intensitat vs temps

| POLS | INTENSITAT (mA) | TEMPS (s) |
|------|-----------------|-----------|
| P1 | 3'55 | 1 |
| P2 | 0 | 1'6 |
| P3 | -7'1 | 0'2 |
| P4 | 0 | 0'2 |

Taula 1. Valors dels pics de la senyal.

Amb el pols proporcionat per el potenciostat, vàrem montar la següent cel·la electrolítica:

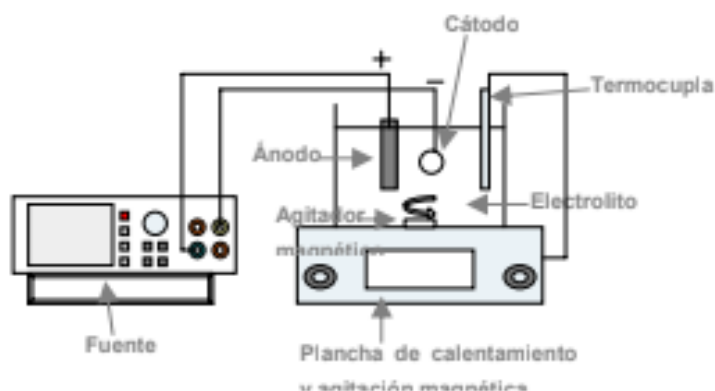


Figura 4.2.2. Esquema del muntatge [2]

On l'ànode, serà una làmina de platí pur, el càtode serà el disc de titani i l'elèctrode de referència de KCl. Tot aquest muntatge es troba amb suspensió dins una solució de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ i $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$ de concentració variable, definida a la Taula 4.4. 1, amb agitació.

4.3. Variables

Un cop descrites les condicions comunes a tots els assaigs a realitzar, és defineixes les diferents variables a estudiar [9].

4.3.1. Temperatura

La temperatura és un factor determinant a la electrodeposició del CaP a la superfície del titani, ja que fent-la variar, es poden aconseguir diferents microestructures i fases. Les dues temperatures a les quals s'ha treballat són 60° i 80° proporcionats per una placa calefactora.

4.3.2. Temps

El temps també es un factor clau en el procés, com més temps estigui la mostra, més gruixuda i compacta serà la mostra, però això no té perquè ser una avantatge, ja que si es deixa massa temps la mostra, es poden formar esquerdes i la capa es pot desprendre del substrat. Els temps amb els que hem treballat han estat 30 i 60 minuts.

4.3.3. pH

La solució originalment té un pH amb un valor al voltant de 4,5, podem dir que és una solució més aviat àcida. Però amb un pH al voltant de 8 és tenen uns millors resultats d'electrodeposició.

4.3.4. Pre-tractament de la superfície

Amb aquest tractament fet deixant durant tota la nit (overnight) les mostres a una dissolució 5 M d'NaOH a 60°C, seguit d'una neteja amb aigua i assecat a l'aire, aconseguim que la superfície del titani es faci més porosa i així millorar l'adhesió dels cristalls de CaP.

4.3.5. Concentració

Jugant amb les concentracions podrem obtenir una capa més ràpida, però un cop s'arriba al límit de saturació de la dissolució el solut es satura, i precipita al fons del recipient per tant no s'aconsegueix el resultat desitjat. Per tant s'ha d'intentar arribar a l'equilibri òptim.

4.3.6. Rati Ca/P

És un derivat de la concentració ja que depèn directament de ells. Canviant la proporció entre molècules de Calci i Fòsfor podrem aconseguir diferents fases del CaP.

4.3.7. Tractament a pressió i temperatura

Per veure si l'estructura interna canvia algunes mostres s'han sotmes també a un procés d'autoclau en el qual han estat 54 minuts a una temperatura de 134°C i 2 bars de pressió

4.4. Sembrat cel·lular

L'assaig de sembrat cel·lular consisteix en avaluar qualitativament l'estat que presenta una línia de cèl·lules coneguda quan es fa sembrat sobre un material donat. En el nostre cas s'han usat

cèl·lules prosteoblàstiques SAOS-2 i discs recoberts de CaP per electrodeposició en diferents condicions.

L'estat de les cèl·lules s'avaluarà al llarg de 72 i 24 hores després de ser sembrades amb SEM. Les mostres estudiades són les següents:

| | Mostra 1 | Mostra 2 | Mostra 3 | Mostra 4 (titani polit) | Mostra 5 (titani sense polir) | Mostra 6 | Mostra 7 | Mostra 8 |
|------------------------------------|----------|----------|----------|-------------------------|-------------------------------|----------|----------|----------|
| Temperatura (°) | 60 | 80 | 60 | - | - | 60 | 80 | 60 |
| Temps (min) | 60 | 60 | 30 | - | - | 60 | 60 | 30 |
| Concentració Ca (mM) | 6'1 | 7'2 | 36 | - | - | 6'1 | 7'2 | 36 |
| Concentració P (mM) | 3'6 | 3'6 | 20 | - | - | 3'6 | 3'6 | 20 |
| Rati Ca/P | 1'69 | 2 | 1'8 | - | - | 1'69 | 2 | 1'8 |
| Pre-tractament de la superfície | Si | Si | No | No | No | Si | Si | No |
| Tractament a pressió i temperatura | No | No | No | No | No | Si | Si | Si |

Taula 4.4. 1 Condicions de cada una de les mostres a les quals hem aplicat el sembrat cel·lular

Dia 1

Primer s'engeguen els raigs ultraviolats de la campana durant 5 min per esterilitzar l'àrea de treball, un cop acabat aixequem la porta de la campana i netegem la superfície amb etanol. Ruixem amb etanol tots els productes que entrem a la campana així com les nostres mans que tindran que portar guants.

Per preparar el medi de cultiu cal preparar una dissolució a un tub Falcon de 50 ml amb els següents components:

- 1 ml HEPES (solució tampó)
- 500 µl Piruvat de sodi (font de C)
- 500 µl L-glutamina (poc estable en medi)

- 500 µl Penicil·lina/Estreptomicina (antibiòtics)
- 5 ml FBS (Factors de creixement per estimular la proliferació)
- Omplir fins a 50 ml amb McCoy 5A (AA, sucres...)

El següent pas és descongelar les cèl·lules SAOS-2 que és troben en un criotub a -80°C al congelador. Per això les introduïrem a un bany de 37° 3 min.

Després dins la cabina agafem 5 ml del medi que hem preparat i el fem dins un tub Falcon de 15 ml. Tot seguit treiem les cèl·lules amb una pipeta de 5 ml, pipetejant de dues a tres vegades el criotub i les passem al Falcon a poc a poc. El següent, és pipetejar contra la paret del Falcon 2 cops per barrejar bé.

Centrifuguem el Falcon per separar el pellet de cèl·lules del medi. Per equilibrar la centrifuga col·locarem un altre Falcon amb la mateixa quantitat de líquid. Posem la màquina 5 minuts, 24 °C i 300 g de força.

(*)Un cop finalitzat el programa de la centrifuga, tornem a la cabina i absorbim el sobrenedant amb una bomba i una punta de vidre per després tornar a resuspendre el pèllet en 6 ml de medi. Posem els 6 ml al flascó de cèl·lules contra la seva base. Tornem a afegir 6 ml de medi al Falcon de les cèl·lules i repetim el procés (*). En total hem de posar 12 ml al flascó. Després i afegim 23 ml de medi i l'agitem fent un recorregut amb forma de 8 sobre la base de la cabina.

Ho posem a la incubadora a 37 °C durant 48h i a les 24h mirar l'estat de les cèl·lules.

Dia 3

Al tercer dia després del primer cultiu, és prepararan les cèl·lules per a l'assaig de 24h, per això caldrà fer el mateix procediment del dia 1. Així ambdós experiments finalitzaran a les 72 hores.

Dia 4

Treure de l'incubador, aspirar el medi dintre de la cabina. Es procedeix a fixar les cèl·lules amb el següent procediment:

- Fixació amb solució de glutaraldeid al 2'5% durant 20 minuts.
- Aspirar el glutaraldeid i rentar amb PBS 2 vegades

- Posar una solució al 50% d'etanol durant 15 minuts per llavors aspirar-lo.
- Posar una solució al 70% d'etanol durant 15 minuts per llavors aspirar-lo.
- Posar una solució al 90% d'etanol durant 15 minuts per llavors aspirar-lo.
- Posar una solució al 96% d'etanol durant 15 minuts per llavors aspirar-lo.
- Posar una solució d'etanol 100% durant 15 minuts, després aspirar i deixar assecar.
- Posar una fina capa de carboni per PVD, per millorar la conductivitat de la mostra.

Un cop fixades les cèl·lules ja és poden observar al SEM.

4.5. Alliberament de Calci

Per veure l'alliberament de ions de Calci de les capes electrodepositades, hem quantificat durant un període de 20 h en el qual hem agafat 12 mesures, fent un anàlisi colorimètric del sobrenedant amb complexos O-cresoftaleina. Aquests complexos quelaten el calci en un medi alcalí, produint un complexa de color violeta en el qual la intensitat d'absorció de la llum mesurada a 570 nm és proporcional a la concentració del Calci.

Dos reactius diferents varen ser preparats per permetre la quantificació del Calci, el reactiu de color complexant i el tampó alcalí.

- Per al reactiu de color, 15 ml d'àcid clorhídric concentrat s'afegiren a un matràs de 250 ml amb 25 ml d'aigua destil·lada. S'hi afegiren 25 mg de complex cresoftaleina en pols, després 250 mg de 8 hidroxiquinolina per eliminar la interferència del magnesi i el ferro. Llavors es va acabar d'omplir fins als 250 ml amb aigua destil·lada i es va transferir a una ampolla de vidre de color marró.
- Per al tampó alcalí, afegirem 37'8 ml de 2-amino-2-metil-1-propanol i 150 ml d'aigua destil·lada a un altre matràs de 250 ml i varem barrejar. Afegint HCl 6M varem ajustar el pH fins a 10'7 i es va omplir fins a 250ml amb aigua destil·lada i es va passar a una ampolla de vidre de color marró.

El sobrenedant de cada mostra, va ser col·lectat durant els següents períodes de temps:

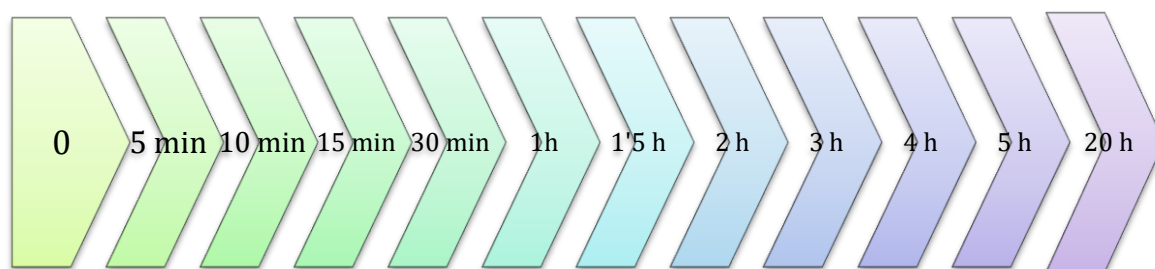


Figura 4.5.1 Línia temporal on es mostren els diferents punts on s'han agafat mostres

Es va emmagatzemar el sobrenedant de cada un dels períodes per a cada una de les mostres dins un *multiwell* de 96 pouets i posteriorment es guardava dins la nevera. Després es va mesurar l'absorbància a 570 nm amb un lector de plaques SynergyTM HTX.

4.6. Assaig de tracció

La força d'adhesió de la capa de CaP al substrat, es va mesurar amb un assaig de tracció segons l'estàndard internacional ASTM F1147. Els discs de Titani varen ser enganxats a uns suports cilíndrics amb un film adhesiu epoxi FM 300K. El film es va curar amb una estufa a 175°C durant 90 minuts segons les instruccions del fabricant. L'assaig de tracció es va realitzar posteriorment a una màquina universal de test (Microtest MT, Microtest, Espanya) a una velocitat d'assaig de 10 mm/min. Cada una de les mostres es va sotmetre a aquest procés per obtenir els diferents valors de força d'adhesió [10].

4.7. Caracterització morfològica

Per a poder observar la microestructura del CaP, i per veure si hi ha cèl·lules adherides a ell en el cas del sembrat cel·lular, s'usa un microscopi de rastreig (SEM) (PHENOM XL desktop SEM) amb un potencial de feix d'electrons de 15 kV.

Les imatges tenen una aparença tridimensional degut a la gran profunditat del focus i a la gran sensibilitat dels electrons secundaris amb la topografia del material.

Els discs de titani, es fixen amb adhesiu de carboni sobre uns suports específics per al microscopi. Després es col·loquen sobre la safata del SEM i s'introdueix per la ranura. Tanquem la porta i espem que es faci el buit. Un cop carregat el SEM tindrem una imatge de la superfície la qual és pot veure nítida fins a mides de 1 μm . També tenim la capacitat de fer fotografies amb el propi software del dispositiu.

4.8. Determinació de la microestructura dels CaP electrodepositats

Per saber en quina fase es troba el nostre CaP (hidroxiapatita, octafosfat de calci,...) es realitza un estudi de difracció de raigs X a les mostres. Els diferents tipus de fase que es troben a la mostra es poden avaluar a partir de l'observació dels pics específics que caracteritzen cada una d'elles en un rang determinat.

L'equip utilitzat és un difractòmetre Bruker, model Advance D8, en configuració Theta/Theta, geometria Bragg-Brentano. Les dades van ser mesurades amb un rang de mesura (2θ) entre 4° i 80° utilitzant una amplitud de pas de $0,02^\circ$, 50 s/ $^\circ$ i un temps de pas de 4 s. El feix d'electrons generadors dels raigs X tenia un $V = 40 \text{ kV}$ i $I = 20 \text{ mA}$.

5. Resultats i discussió

5.1. Resultats SEM

5.1.1. Resultats electrodeposició

Els primers experiments, es varen realitzar fent la electrodeposició en una solució 0,042 M de $\text{Ca}[\text{NO}_3]_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ i 0,025 M d' $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$. Amb la qual es varen fer experiments de 30min a 60°C de temperatura. L'únic que va variar entre els 2 experiments realitzats, va ser el pH que en una es va augmentar mitjançant una solució 1M d' NaOH fins obtenir un pH de 9.

Un inconvenient d'aquest sistema, va ser que al afegir l' NaOH , la solució es saturava i precipitava. Tot i que es començaven a veure petits cristalls de CaP dipositats a la superfície. Les mostres obtingudes amb aquest mètode es varen descartar.

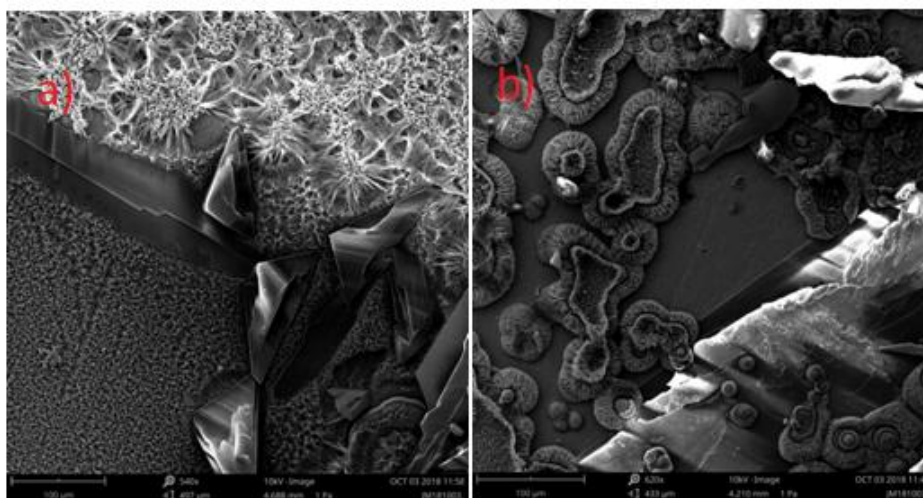
2na LÍNEA EXPERIMENTAL

Es realitzaren els dos experiments anteriors, però amb un nou contraelectrode (làmina de platí pur) i un nou elèctrode de referència. Els resultats obtinguts a microscòpia varen ser els següents:

| | 2.a | 2.b |
|-----------------|---------|---------|
| Temperatura (°) | 60 | 60 |
| Temps (min) | 30 | 30 |
| pH | 4'5 | 8'5 |
| Concentració Ca | 0'042 M | 0'042 M |
| Concentració P | 0'025 M | 0'025 M |
| Rati Ca/P | 1'68 | 1'68 |
| Overnight | No | No |

Taula 5.1.1. 1 Condicions de les mostres de la 2na Línea experimental

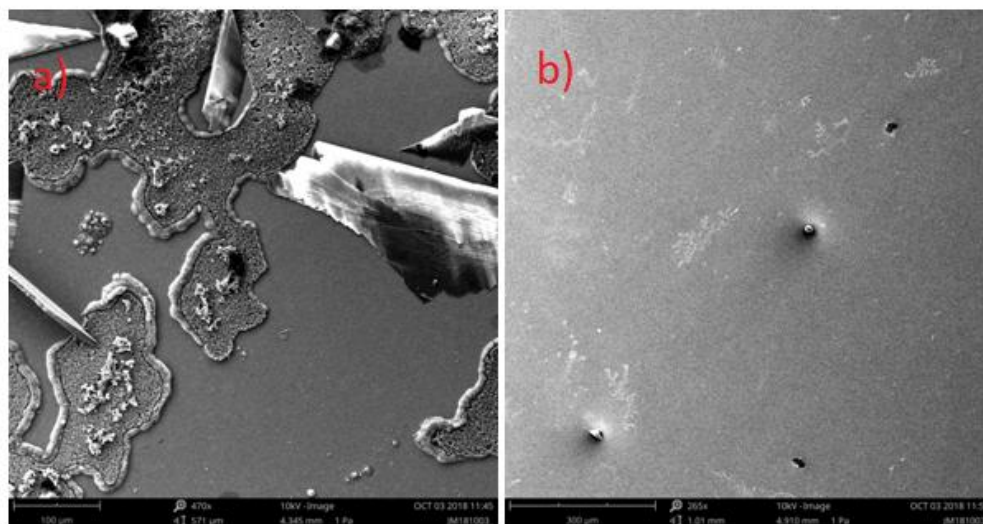
- 2.a) Podem veure com es formen nucleacions de cristalls de CaP però pareix ser que no ha donat temps a tenir una superfície uniforme. Es veuen fragments del titani a la superfície i hi ha cristalls amb diferents estructures, agulles i plaques.



Imatge 5.1.1 a) Veiem l'estructura d'agulles a la part alta de la imatge i plaques al costat dret de la part inferior. b) Al canto esquerra superior observem les nucleacions.

- 2.b) Els resultats són similars a l'anterior, però podem observar que hi ha molta zona de la mostra a la qual no s'ha dipositat ningun cristall. Segons la bibliografia el pH lleugerament

bàsic ajuda a la formació de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ però a aquest cas, ha passat al contrari, segurament per l'esmentat anteriorment de que la solució es trobava per damunt del límit de saturació.



Imatge 5.1.2. a) Cristalls grans i nucleacions. b) Capa de titani sense deposició.

3era LÍNEA EXPERIMENTAL

La hidroxiapatita té una relació de Ca/P al voltant de 1'66, les relacions obtingudes als experiments anteriors eren molt menors per el que s'optà per augmentar la concentració de $\text{Ca}[\text{NO}_3]_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ a 0'05 M per així tenir una relació de 2.

Per validar aquesta hipòtesis és realitzà un disseny de l'experimental ja que es tenen les següents variables:

- Relació CaP
 - 1'66
 - 2
- Temperatura
 - 60°C
 - 80°C
- pH
 - Original (4'5)
 - 7

Per tant s'opta per fer aquests 4 experiments representatius.

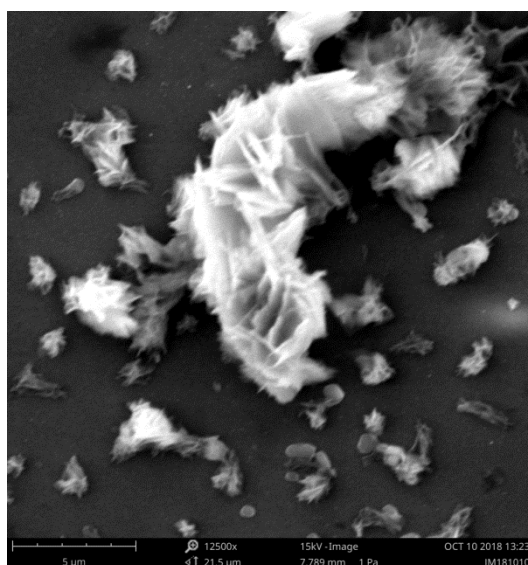
| | 3.a | 3.b | 3.c | 3.d |
|---------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| Temperatura (°) | 60 | 80 | 80 | 60 |
| Temps (min) | 30 | 30 | 30 | 30 |
| pH | 4'5 | 4'5 | 7 | 7 |
| Concentració Ca [M] | 0'042 | 0'05 | 0'05 | 0'042 |
| Concentració P [M] | 0'025 | 0'025 | 0'025 | 0'025 |
| Rati Ca/P | 1'68 | 2 | 2 | 1'68 |
| Pre-tractament de la superfície | No | No | No | No |

Taula 5.1.1. 2 Condicions de les mostres de la 3era Línea experimental

Per obtenir dades significatives s'estudien els següents casos:

3.a) Aquest experiment ja es va realitzar a l'anterior línea experimental, per tant ja es tenen els resultats. (experiment a 2na línea experimental)

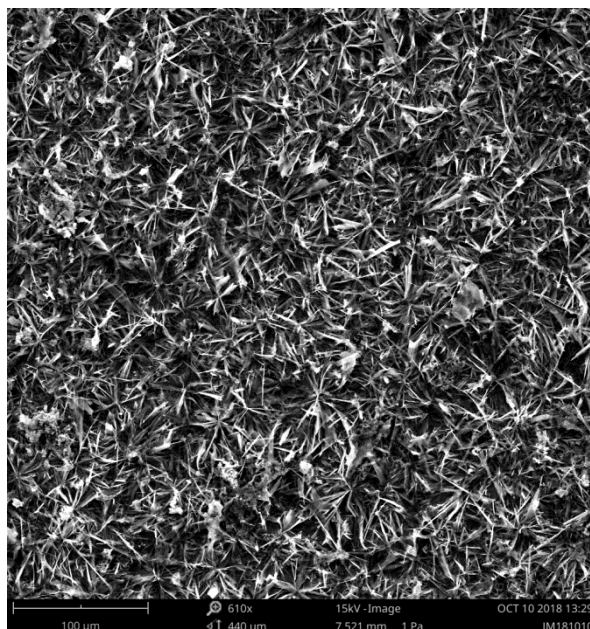
3.b) En aquest cas observem agrupacions de cristalls de diferents mides però d'igual estructura per tota la mostra.



Imatge 5.1.3. Estructura esporàdica de cristalls on s'aprecia el fons de Titani

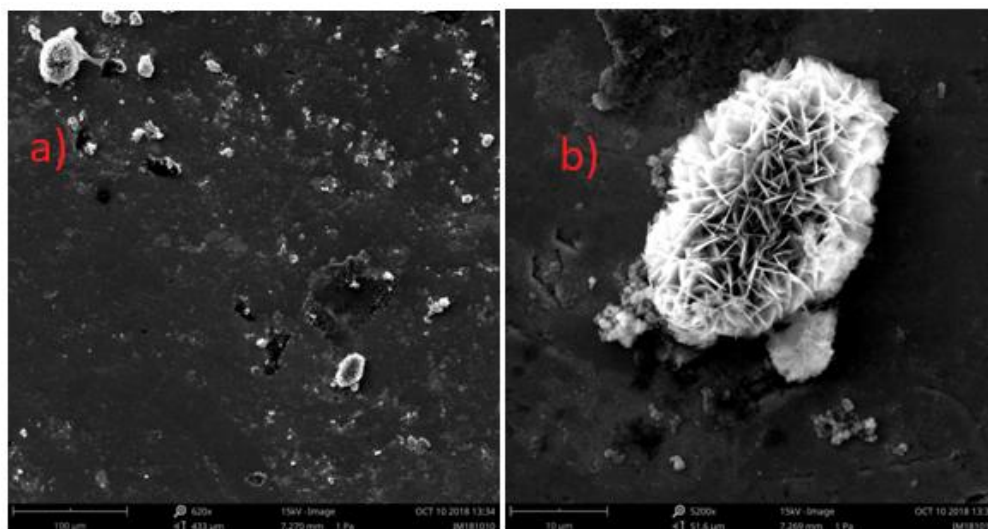
El primer inconvenient és que per aquesta concentració la dissolució es troba saturada.

- 3.c) En aquesta mostra és trobà per primer cop el que s'esperava, una capa uniforme de cristalls de CaP, en aquest cas en forma d'agulla. Les altes temperatures ajuden a la electrodeposició de el CaP, així com el pH, en aquest cas neutre, ajuda a la formació d'una capa uniforme i gruixuda, ja que no es veu la superfície de titani.



Imatge 5.1.4. Capa uniforme de cristalls amb morfologia d'agulla

- 3.d) En aquest cas quasi no hi ha deposició, llevat d'alguns petits inicis de nucleació. Com en el cas 2.b) veiem que pujar el pH amb NaOH no ajuda a la precipitació així com ens indica la literatura [15]. Tot i que hi ha petits cúmuls de cristalls, no és la capa uniforme esperada. Però en el cas de la mostra c) d'aquesta línia sí que podem observar que s'han obtingut uns bons resultats amb pH modificat, per la qual cosa podem arribar a la conclusió de que la temperatura és un factor més determinant en la formació d'una capa de cristalls de CaP que el pH.



Imatge 5.1.5. a) Imatge a 620 augments on es veu una superfície quasi llisa. b) Cristall de CaP a 5200 augments.

4ta LÍNEA EXPERIMENTAL

Per evitar la sedimentació observada en experiments anteriors s'han assajat unes concentracions molt més baixes a les emprades anteriorment.

- $\text{Ca}[\text{NO}_3]_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} \Rightarrow 0'61 \text{ mM}$
- $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4 \Rightarrow 0'36 \text{ mM}$

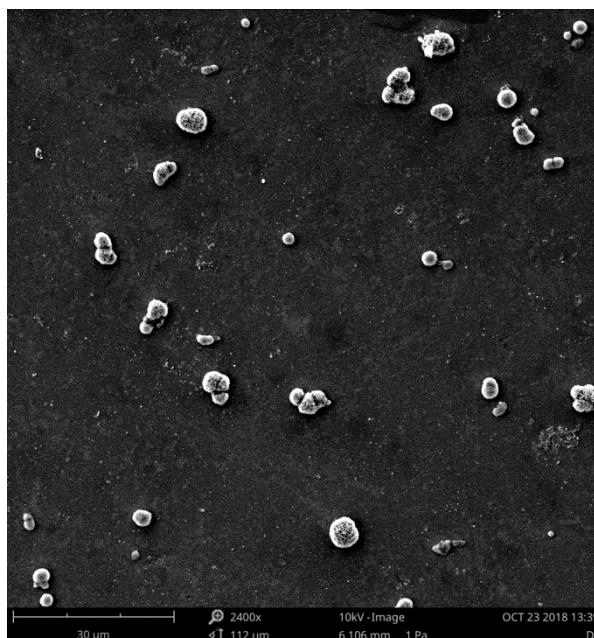
Amb aquestes noves concentracions, es realitzen els següents experiments:

| | 4.a | 4.b | 4.c | 4.d |
|---------------------------------|------|------|------|------|
| Temperatura (°) | 60 | 60 | 80 | 80 |
| Temps (min) | 60 | 60 | 60 | 60 |
| pH | 4'5 | 8 | 8 | 4'5 |
| Rati Ca/P | 1'69 | 1'69 | 1'69 | 1'69 |
| Pre-tractament de la superfície | No | No | No | No |

Taula 5.1.1. 3 Condicions de les mostres de la 4ta Línea experimental

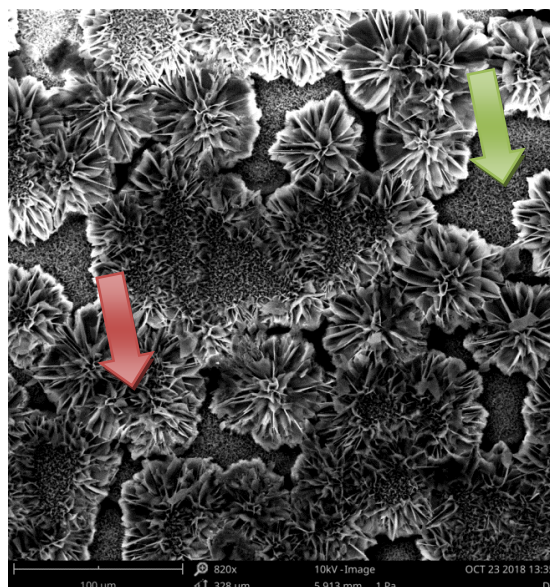
4.a), 4.b) 4.c) En aquests 3 primers casos no es va observar res segurament degut a la mínima concentració de la dissolució la qual amb la curta durada de l'experiment no donava temps a la formació de una capa de fosfat de calci. Per tant també es va descartar aquesta opció

4.d) Només en aquest cas es varen observar petites nucleacions esporàdiques per la superfície de la mostra. Per la qual cosa és va arribar a la conclusió de que aquesta concentració era massa baixa per la durada dels experiments que s'havien realitzat. Amb temps més llargs possiblement s'hagués arribat a bons resultats, però per el gran nombre de experiments a realitzar, no era una opció viable.



Imatge 5.1.6. Petits cúmuls de CaP sobre la superfície de Titani

4.e) Ja que era d'esperar els resultats obtinguts amb aquestes concentracions tan baixes, es va provar d'augmentar x10 la concentració i amb aquesta nova solució recrear l'experiment a) d'aquesta secció. Els resultats varen ser positius ja que s'observava una capa inicial formada per cristalls amb forma d'agulla i una capa més superficial amb cristalls més grans.



Imatge 5.1.7. Verd: Capa superficial de cristalls grans, Roig: Capa més profunda amb cristalls d'agulla

5ta LÍNEA EXPERIMENTAL

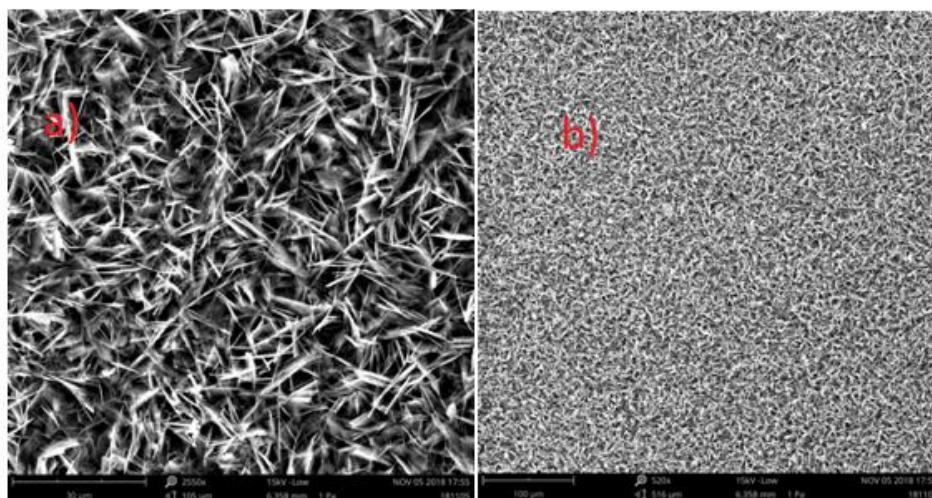
Continuant els bons resultats obtinguts a l'assaig e) de l'anterior línia experimental es va decidir continuar per aquell camí. Ja que es va observar que la capa més superficial no es va acabar de formar del tot és va fer un pre-tractament de la superfície, submergint 3 mostres durant 18 hores en una dissolució d'NaOH 5 M a 60°C (tractament overnight secció 4.3.4. Així obtindríem una superfície més rugosa i amb una química superficial modificada que per facilitar el creixement dels cristalls. Les condicions dels experiments realitzats són les següents:

| | 5.a | 5.b | 5.c |
|-----------------------------|------|-----|------|
| Temperatura (°) | 60 | 80 | 60 |
| Temps (min) | 60 | 60 | 120 |
| pH | 4'5 | 4'5 | 4'5 |
| Concentració Ca (mM) | 6'1 | 7,2 | 6'1 |
| Concentració P (mM) | 3'6 | 3'6 | 3'6 |
| Rati Ca/P | 1'69 | 2 | 1'69 |

| | | | |
|---------------------------------|----|----|----|
| Pre-tractament de la superfície | Si | Si | No |
|---------------------------------|----|----|----|

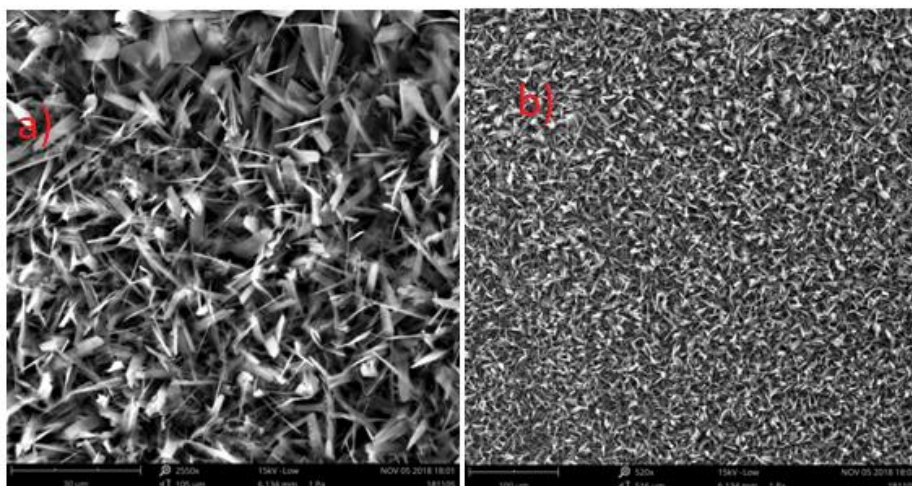
Taula 5.1.1. 4 Condicions de les mostres de la 5ta Línea experimental

5.a) S'ha obtingut una mostra homogènia de cristalls amb forma d'agulla, la qual s'estén per tota la mostra. La capa té molt de gruix ja que no deixa veure la superfície de Titani. Aquesta concentració pareix ser la ideal per obtenir capes homogènies, amés amb 60 minuts d'exposició no s'observen nucleacions, sinó que tota la estructura està unida.



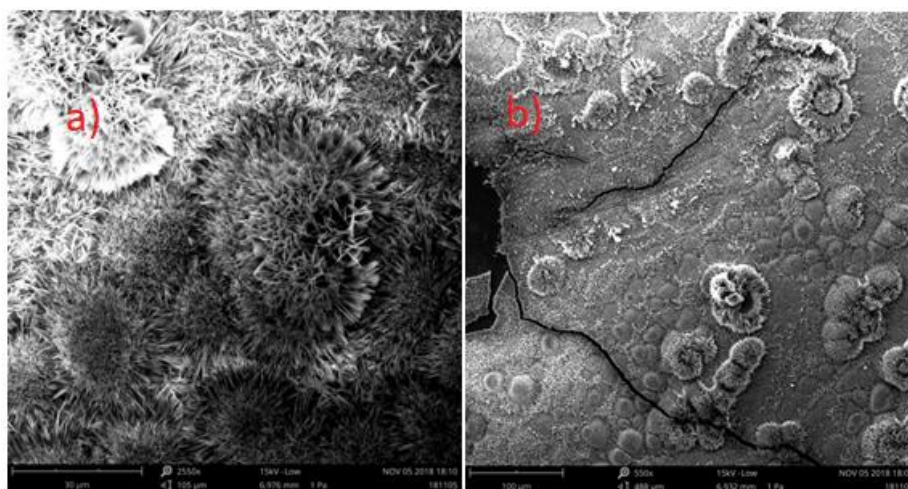
Imatge 5.1.8. a) Cristalls a 2550 augments. b) Pla general de la mostra a 520 augments

5.b) Resulta similar a la mostra a), però els cristalls ja no són agulles sinó que han agafat amplada i són més similars a una cinta. La temperatura com ja hem dit anteriorment ajuda a la proliferació del CaP en aquest cas ens aporta uns cristalls més robusts que amb les mateixes condicions però a 60 °C.



Imatge 5.1.9. a) Cristalls a 2550 augments. b) Pla general de la mostra a 520 augments

5.c) A l'augmentar el temps d'exposició, s'ha aconseguit una capa molt més compacta i aparentment molt més gruixuda. A conseqüència la capa s'ha després a moltes parts de la mostra i s'observen esquerdes.



Imatge 5.1.10. a) imatge a 2550 augments on s'aprecia la compactació dels cristalls. b) imatge a 550 augments on es veuen les esquerdes.

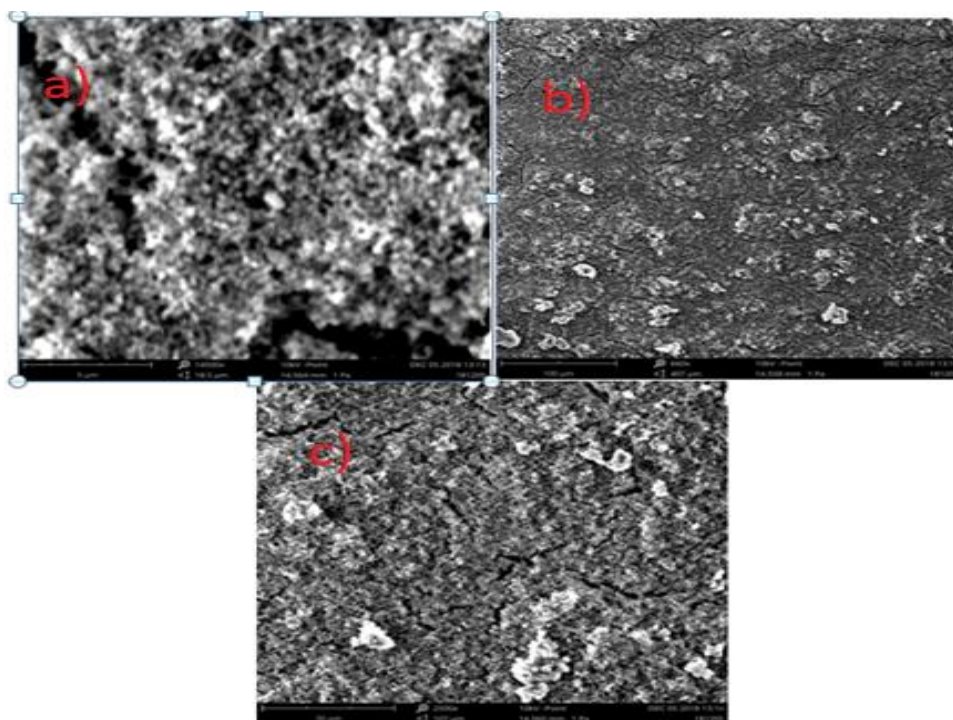
6ta línia experimental

Un cop aconseguides diferents formes de cristalls, varem optar per obtenir diferents morfologies. Segons la bibliografia [9], aplicant un corrent 10 cops més elevat de l'aplicat fins aleshores podíem obtenir una capa de CaP amorfa, no cristal·lina amb una estructura similar a una coliflor. Per això aplicarem un corrent de $12'9 \text{ mA/cm}^2$.

| Variables | 6.a | 6.b | 6.c | 6.d | 6.e |
|---------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| Temperatura (°C) | 60 | 60 | 80 | 60 | 80 |
| Temps (min) | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 |
| Pre-tractament de la superfície | Si | No | No | No | No |
| Concentració Ca (mM) | 7'2 | 7'2 | 7'2 | 36 | 36 |
| Concentració P (mM) | 4 | 4 | 4 | 20 | 20 |

Taula 5.1.1. 5 Condicions de les mostres de la 6ta Línia experimental

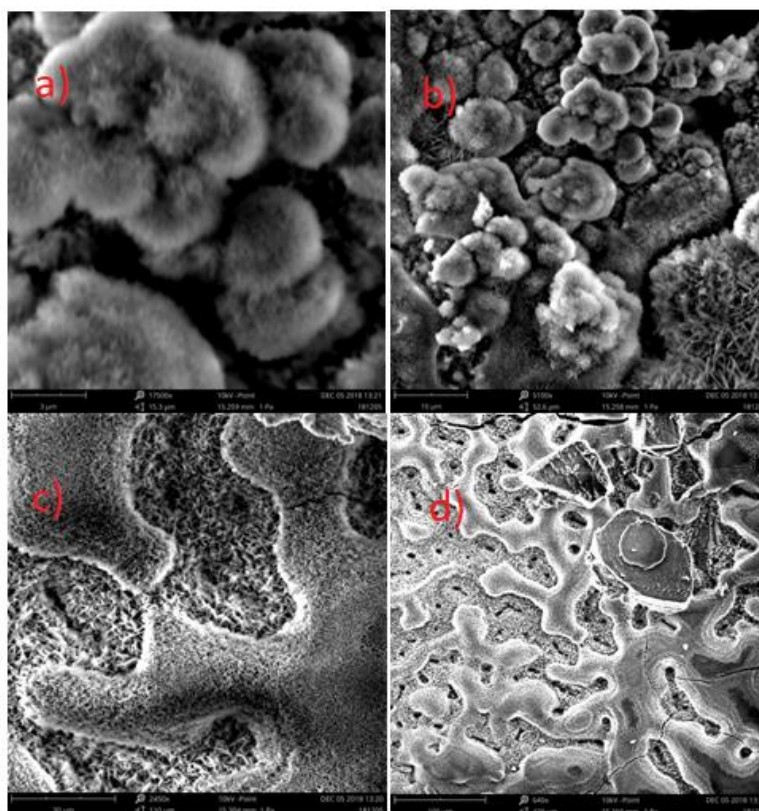
6.a)



Imatge 5.1.11. a) Estructura amorfa a 14500 augments. b) Plà general a 660 augments. c) Petites esquerdes a la superfície a 2500 augments

En aquest cas, si o observem amb molts d'augment, si que es poden veure microestructures similars a les de la literatura, petites formacions esfèriques apilades una damunt l'altre, que ens recorden a una coliflor. També podem observar que hi ha esquerdes per tota la superfície, això ens denota que l'adhesió del CaP no és l'òptima, tot i tenir un pre-tractament de la superfície.

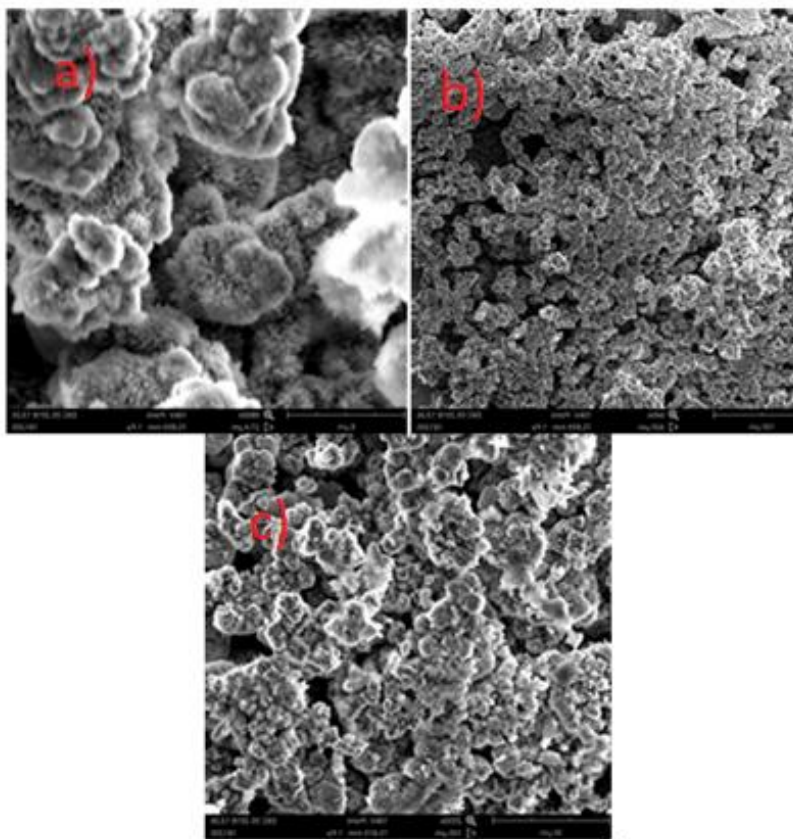
6.b)



Imatge 5.1.12. a) Estructura no cristal·lina a 17500 augments b) Estructura no cristal·lina sobre un fons cristal·lí a 5100 augments c) Dues capes superposades 2450 augments d) Dues capes superposades 640 augments

Per aquestes condicions, s'observen dues capes clarament diferenciades, una primera capa uniforme amb cristalls amb forma de cinta i, una segona capa més superficial on a les vores es formen estructures no cristal·lines. Segurament aquest fenomen es pot explicar ja que no tenim pre-tractament de la superfície i l'adhesió és més lenta, per això no ha acabat de formar-se la capa superficial.

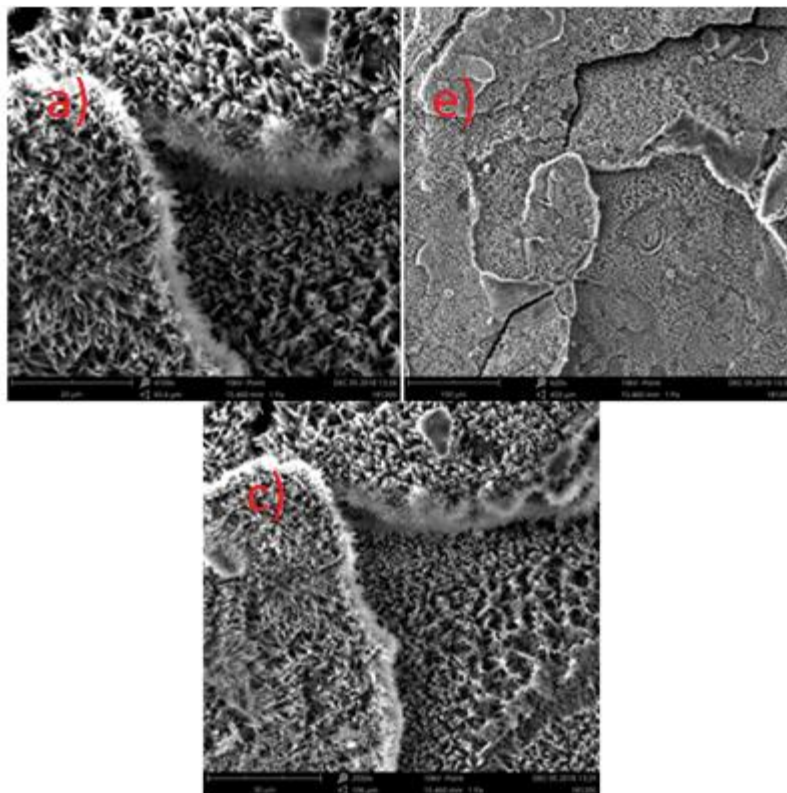
6.c)



Imatge 5.1.13. Diferents visions d'estructures no cristal·lines (a)9800 augments, b) 640 augments, c) 2550 augments)

Aquí, com era d'esperar segons la bibliografia [9], a alta temperatura, obtenim una microestructura mes marcada i més homogènia.

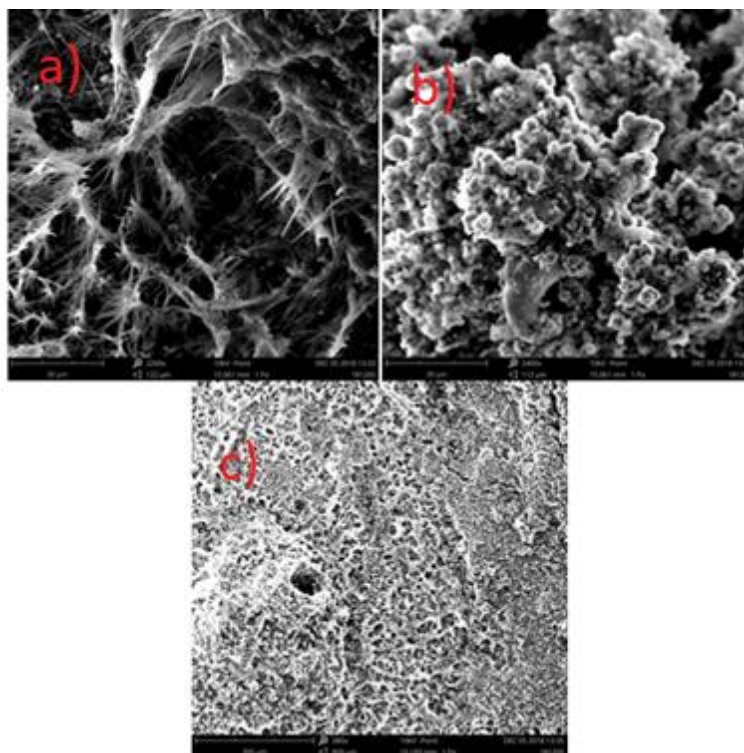
6.d)



Imatge 5.1.14. Imatges de la superfície (a)4100 augments, b) 2550 augments, c) 620 augments)

Es va decidir augmentar la concentració de la dissolució de Ca i P, ja que amb l'anterior havíem tingut problemes degut a l'alt potencial que es generava entre els elèctrodes i el potenciostat arribava al seu límit. Pujant la concentració obtenim un medi més conductor i baixa el potencial. Però observem que la superfície formada es de cristalls amb forma de cinta i amb diferents plans superposats uns sobre els altres. No tenim cap indici de haver aconseguit la microestructura amorfa.

6.e)



Imatge 5.1.15. a) Estructura en forma de xarxa a 2200 augments. b) Estructura amorfa a 2400 augments.
c) Visió general de la superfície a 280 augments.

Si ens fixem en la fotogràfica a menys augments, podríem dir que es tracta d'una superfície uniforme, però si els augmentem, podrem veure que hi ha dos microestructures. L'amorfa, que era l'esperada, i una que no ens havíem trobat mai al llarg de totes les proves realitzades. En aquesta podem observar petits filaments de que formen una xarxa.

5.1.2. Discussió electrodeposició

L'objectiu d'aquest part del projecte que era aconseguir diferents tipus de capa per després avaluar les seves propietats és va aconseguir. A més, gràcies a ells hem pogut atribuir formacions a diferents factors com temperatura concentració i corrent dels polsos.

Parlant de la temperatura, hem observat que afavoreix a la formació de CaP com era d'esperar, les capes realitzades a 80° C tenen una aparença més robusta així com uns cristalls més gruixuts.

A simple vista el rati de Ca/P no interfereix en la forma de la capa, el factor que més influeix és la concentració, la qual ha de ser òptima. La que millors resultats ha donat ha estat la de 7'2 mM Ca i 3'6 mM P, ja que s'observa una capa homogènia i regular.

També és molt interessant el fet de poder canviar la morfologia dels cristall aplicant polsos de corrent més elevats, ja que observem l'aparició de morfologies diferents que, com hem pogut comprovar més endavant, tenen distintes propietats.

5.1.3. Resultats sembrat cel·lular

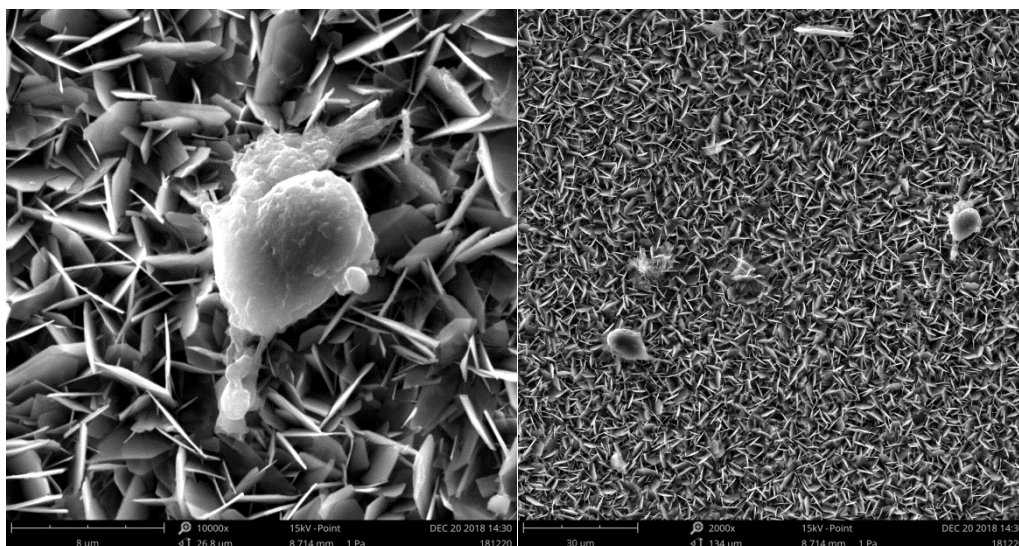
A continuació es veren els resultats del SEM de les mostres amb sembrat cel·lular. Primer s'analitzaran els resultats de les cèl·lules que es varen passar 72 hores a l'incubador, i després les de 24 hores. Les mostres analitzades tenien les mateixes condicions en els dos períodes d'incubació, i és veuen a la Taula 5.1.3.1. Aquestes han estat escollides com les més significatives entre tots els experiments realitzats, ja que mostren diferents estructures i tenen una capa significativa de CaP. Les imatges estan disposades de la següent manera: a la dreta imatge amb detall a 2000 augments i a l'esquerra una fotografia més general a 500 augments per així poder fer una millor comparativa entre tots els casos.

| | Mostra 1 (5.a) | Mostra 2 (5.b) | Mostra 3 (6.d) | Mostra 4 (titani polit) | Mostra 5 (titani sense polir) | Mostra 6 | Mostra 7 | Mostra 8 |
|------------------------------------|----------------|----------------|----------------|-------------------------|-------------------------------|----------|----------|----------|
| Temperatura (°) | 60 | 80 | 60 | - | - | 60 | 80 | 60 |
| Temps (min) | 60 | 60 | 30 | - | - | 60 | 60 | 30 |
| Concentració Ca [mM] | 6'1 | 7'2 | 36 | - | - | 6'1 | 7'2 | 36 |
| Concentració P [mM] | 3'6 | 3'6 | 20 | - | - | 3'6 | 3'6 | 20 |
| Rati Ca/P | 1'69 | 2 | 1'8 | - | - | 1'69 | 2 | 1'8 |
| Pre-tractament de la superfície | Si | Si | No | No | No | Si | Si | No |
| Tractament a pressió i temperatura | No | No | No | No | No | Si | Si | Si |

Taula 5.1.3. 1 Condicions de les mostres

24h

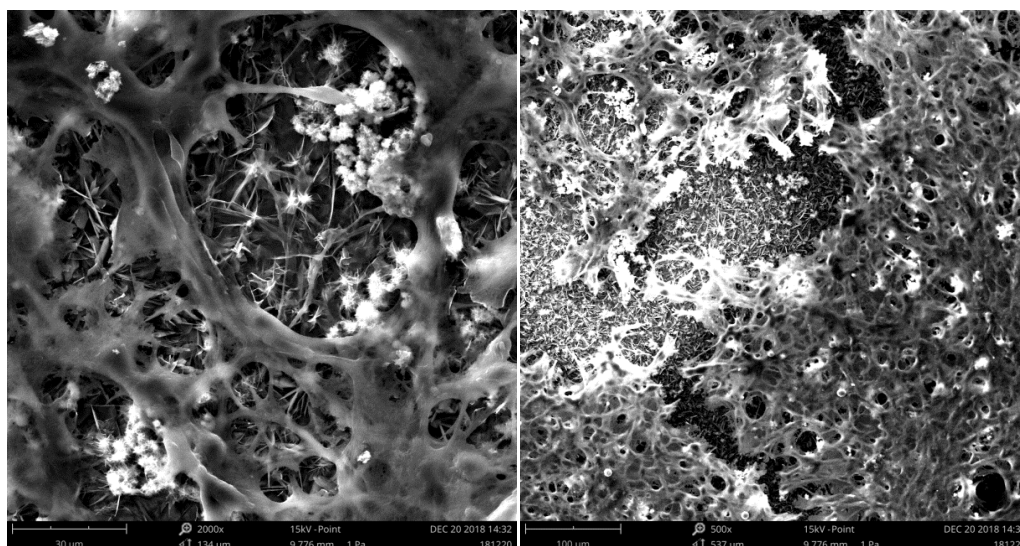
1)



Imatge 5.2.1.

S'aprecien molt poques cèl·lules a la superfície amb una forma arrodonida la qual no és la que s'espera d'aquest tipus, ja que són cèl·lules molt similars als osteoblasts que estan estirats sobre la matriu òssia.

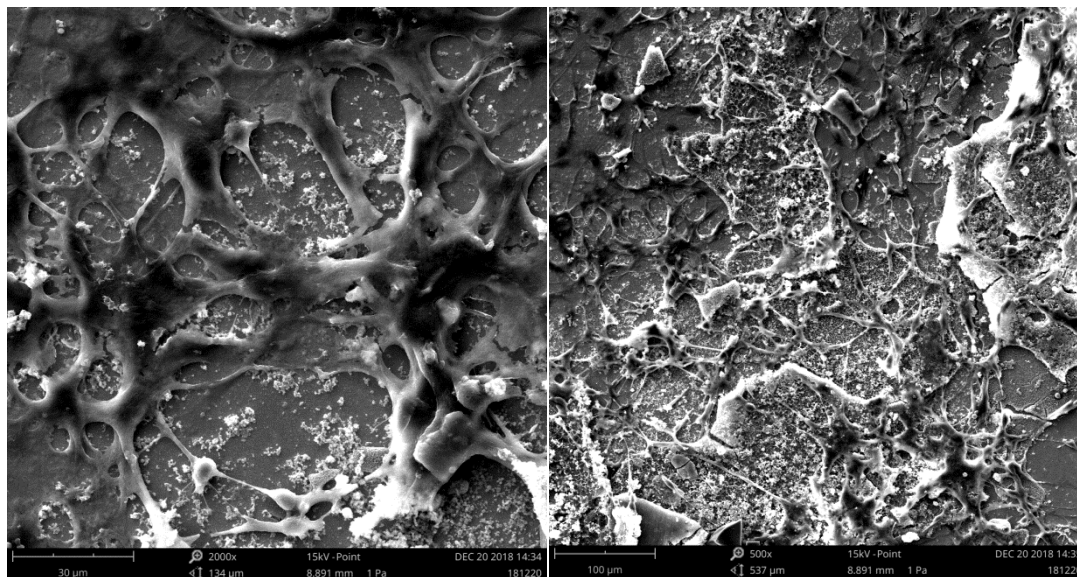
2)



Imatge 5.2.2.

Veiem una xarxa molt densa de cèl·lules ben exteses i amb pseudopòdes, inclús tapant la capa de CaP en algunes zones.

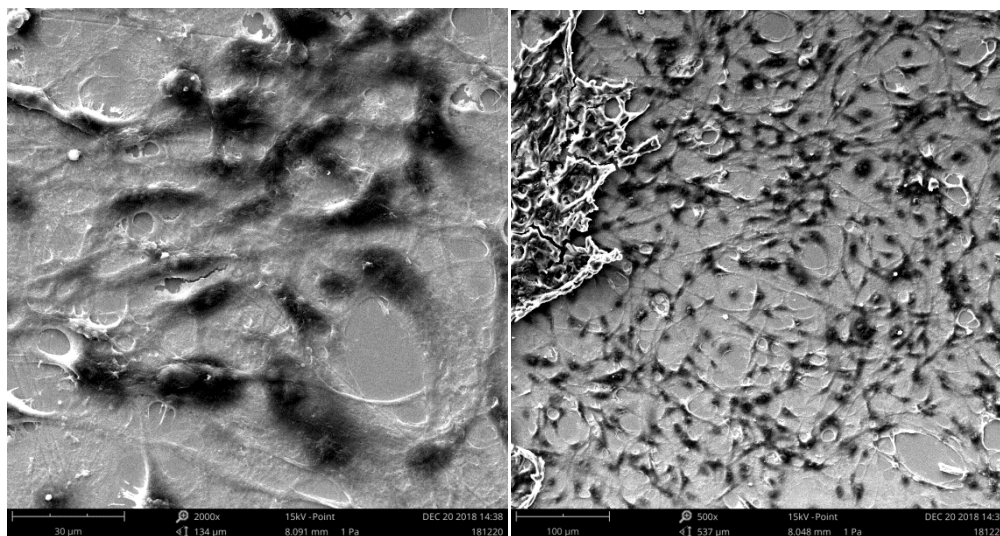
3)



Imatge 5.2.3.

L'agrupació de cèl·lules s'aprecia perfectament tot i que no té una densitat tan alta com a la microestructura d'agulles del cas anterior.

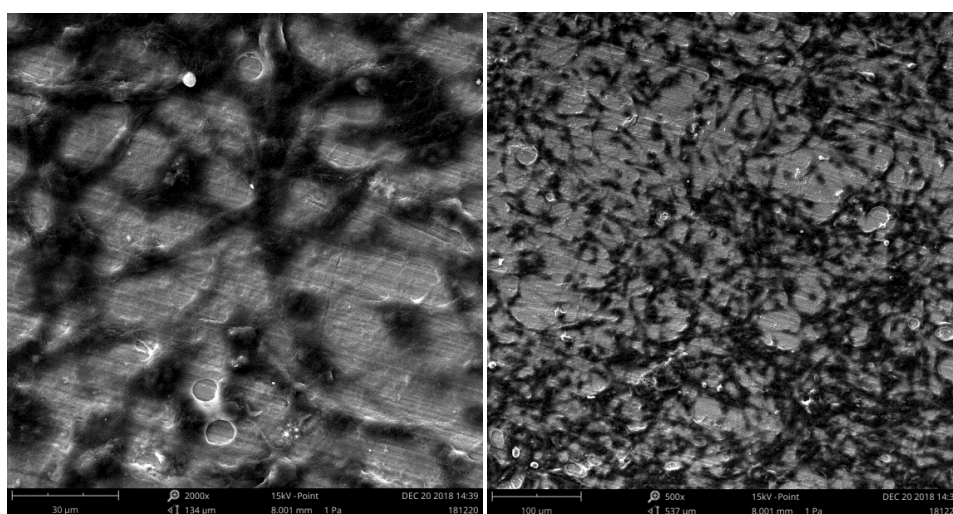
4)



Imatge 5.2.4.

En el cas del titani llis, a les 24h podem veure que hi ha més cèl·lules que al llarg de les 72, però no hi ha tanta disminució com a les mostres amb electrodeposició. És a dir que amb 24 hores no hi ha tantes cèl·lules com amb el CaP, però 48 hores després el nombre no decreix tant i acaba superant-lo. Les cèl·lules que observem estan molt adherides a la superfície ja que no s'aprecia quasi volum, estan totalment estirades.

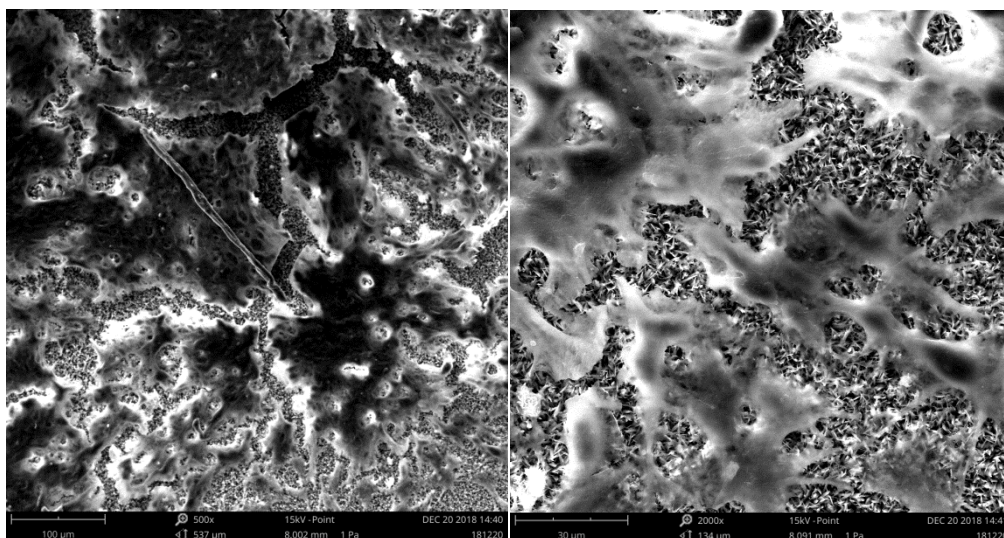
5)



Imatge 5.2.5.

És el mateix cas que el titani polit, tot i que s'observa una major densitat i un major nombre d'unions entre cèl·lules.

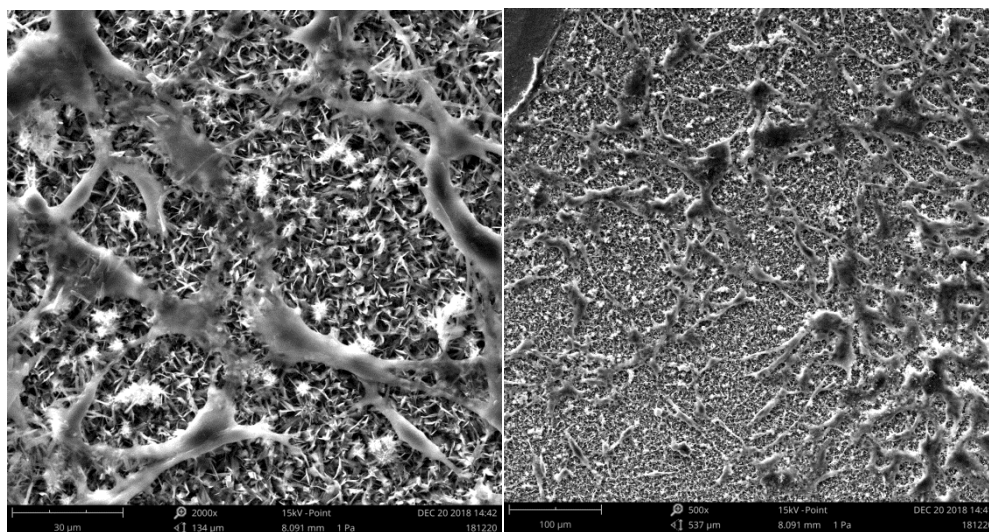
6)



Imatge 5.2.6.

Aquesta capa és tan densa que ja no es pot veure la morfologia de les cèl·lules sinó que s'ha format una capa però que no cobreix tota la superfície, més aviat creixen a voltant de punts de nucleació.

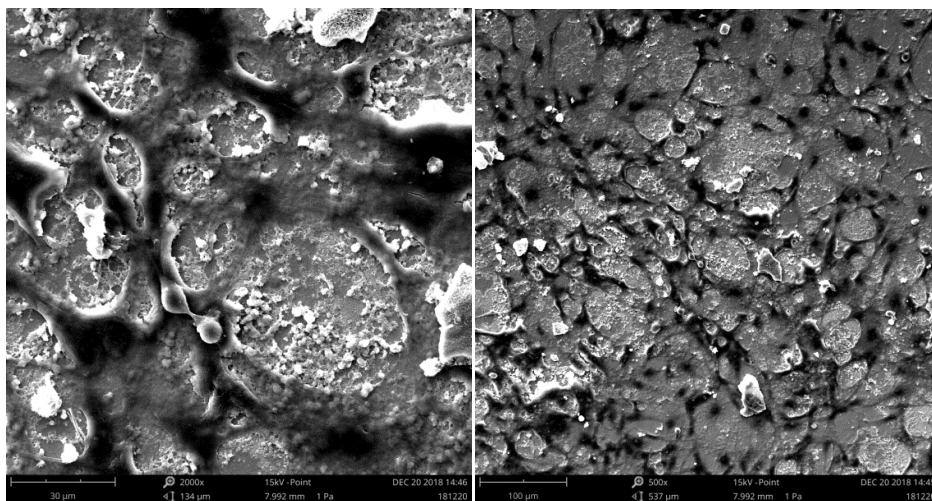
7)



Imatge 5.2.7.

Cèl·lules disposades de manera molt similar a totes les altres amb capa de CaP, tal vegada menys densa que les altres.

8)

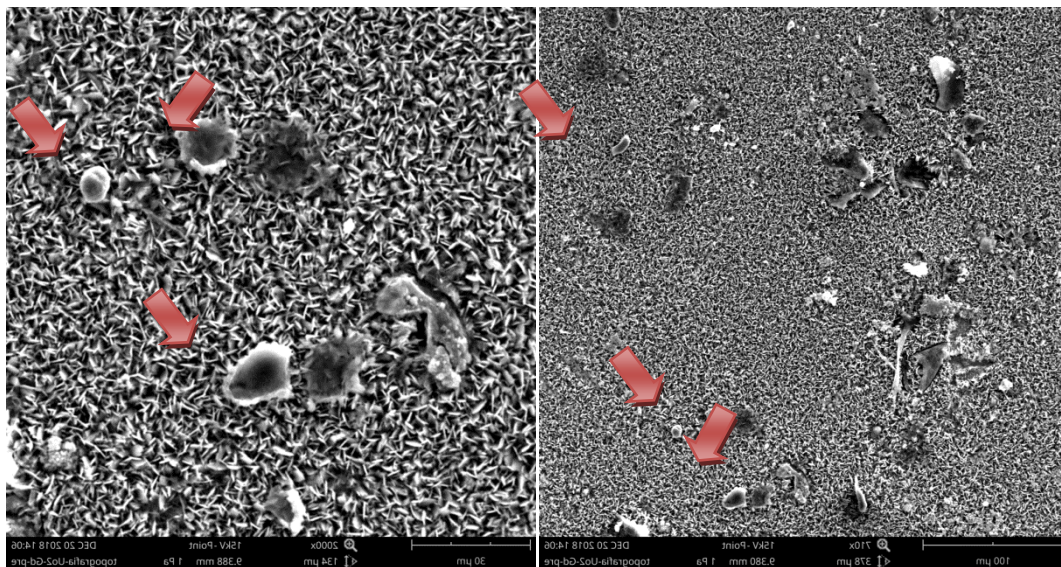


Imatge 5.2.8.

Les cèl·lules es troben també molt estirades sobre la superfície, d'una manera molt similar al titani sense recobriment.

72 h

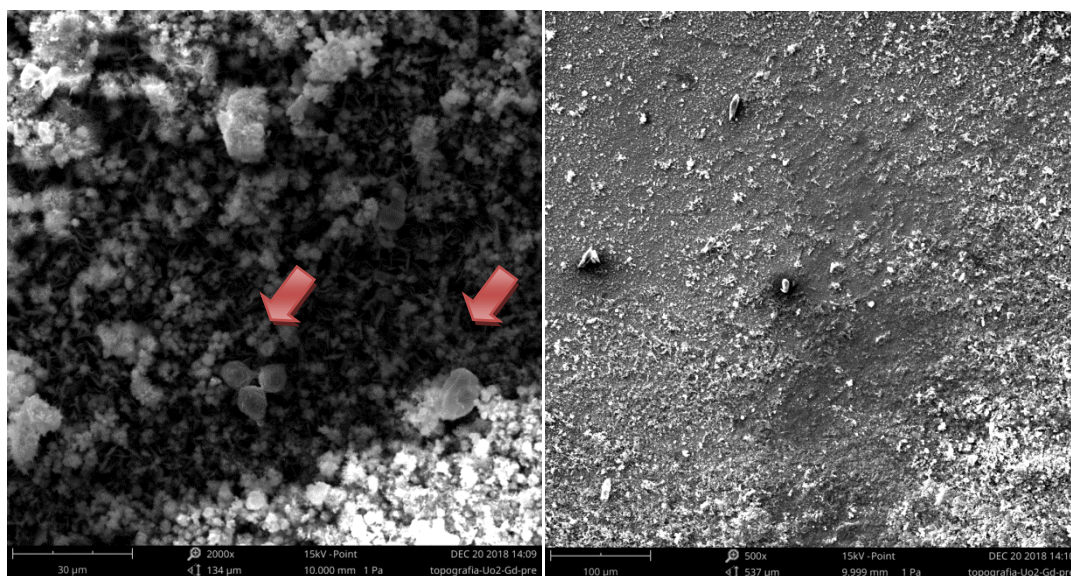
1-



Imatge 5.2.9. Fletxes roges marquen les cèl·lules sobre la superfície

Com podem observar, sobre la superfície de cristalls en forma d'agulla, trobam cèl·lules de forma cilíndriques disperses i sense unió entre elles.

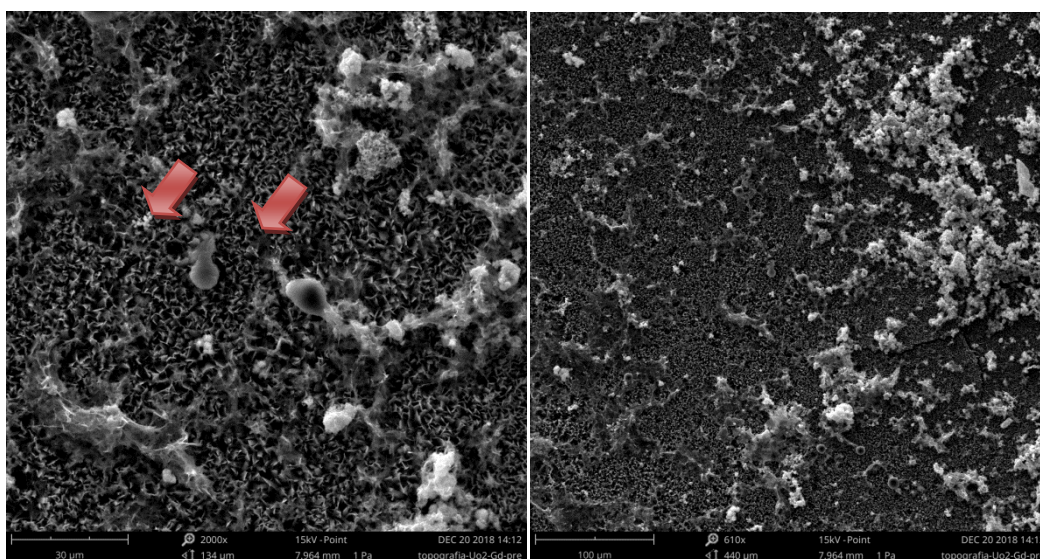
2-



Imatge 5.2.10. Fletxes roges marquen les cèl·lules sobre la superfície

Observem molt poques cèl·lules, les que hi ha de menor mida que en el cas anterior però mantenint la forma arrodonida, per la qual cosa podem pensar que a les cèl·lules els costa viure en una superfície d'aquestes característiques.

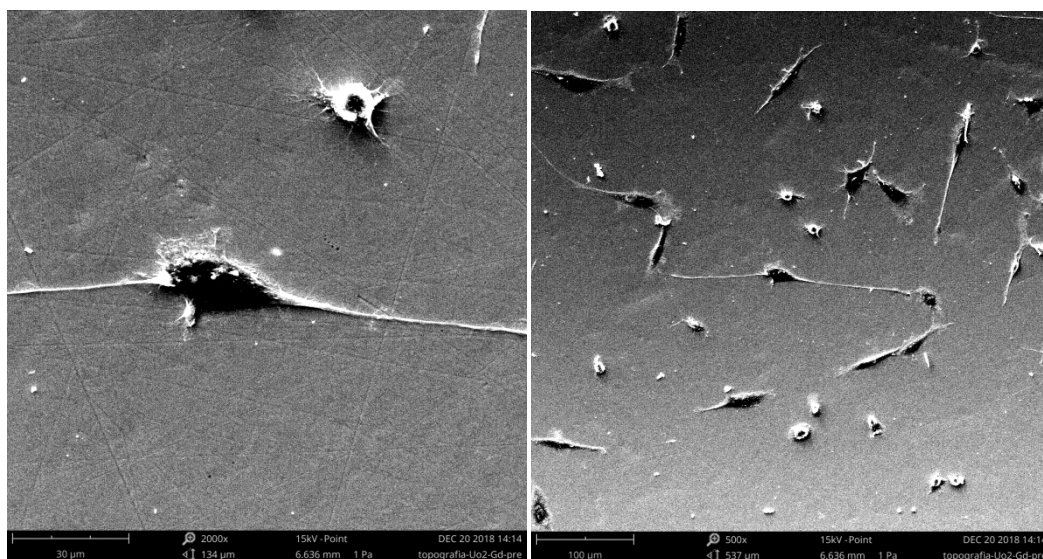
3-



Imatge 5.2.11. Fletxes roges marquen les cèl·lules sobre la superfície

Es tracta de la mostra amb microestructura amorfa no cristal·lina, tot i que com podem observar a la imatge només s'han format grups d'aquesta microestructura sobre una capa més interna amb forma d'agulla. El més rellevant, és que les cèl·lules semblen ser més nombroses a les zones amb l'estructura amorfa. Aquestes ja no tenen una forma tan esfèrica sinó que són més irregulars, i semblen estar més integrades a l'estructura.

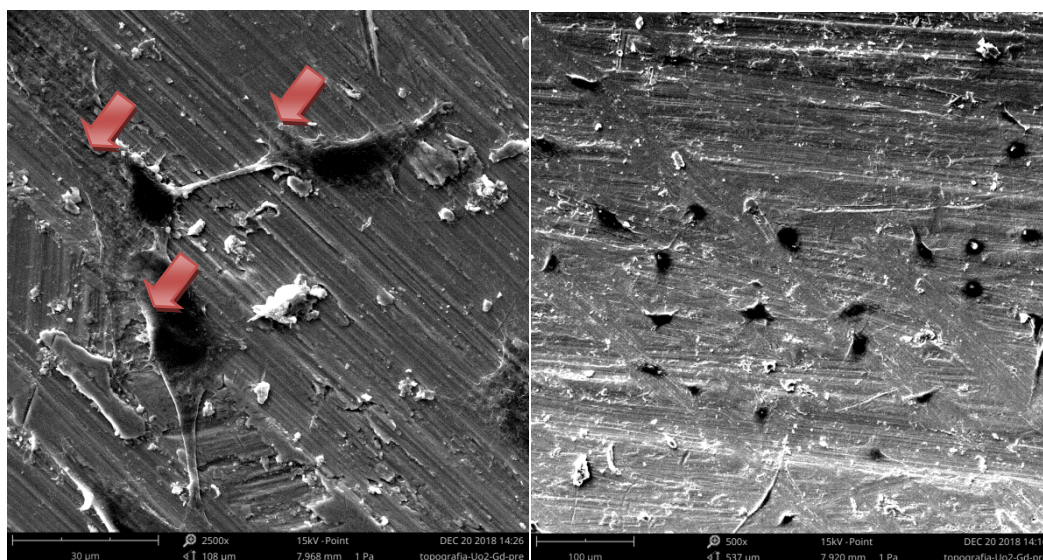
4-



Imatge 5.2.12. Cèl·lules estirades sobre el Titani polit

Aquest és un dels dos casos control, en concret el titani amb superfície polida. S'hi aprecien moltes més cèl·lules que en la superfície així com una forma més corrent per aquest tipus de cèl·lules.

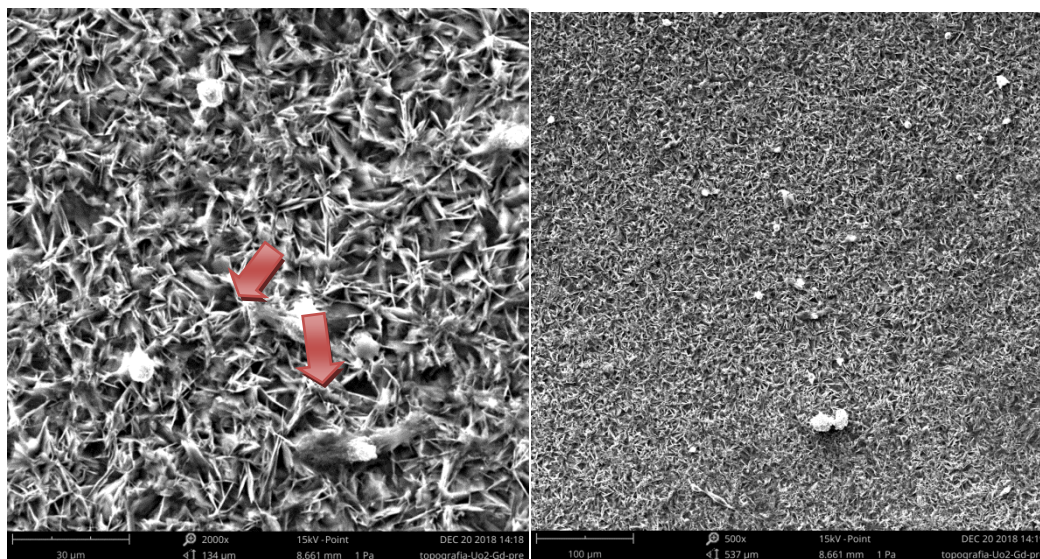
5-



Imatge 5.2.13. Les fletxes roges marquen les cèl·lules sobre la superfície del Titani rugos

En aquest cas tenim la superfície de titani sense polir. Els resultats són molt similars als de la superfície polida. Tot i que les cèl·lules semblen tenir una major fixació sobre aquesta superfície.

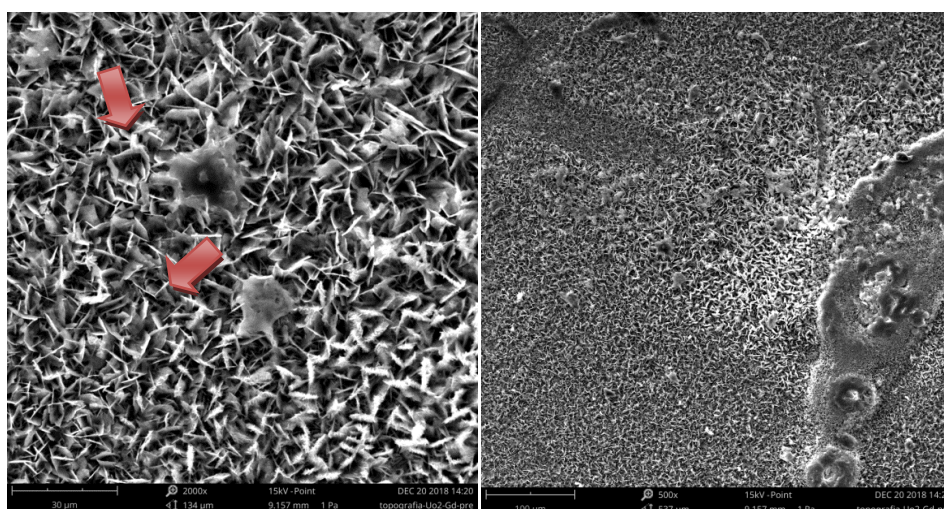
6-



Imatge 5.2.14. Fletxes roges marquen les cèl·lules sobre la superfície

Aquesta mostra és la mateixa que la mostra 1 però amb un tractament de pressió i temperatura amb el qual canviem la fase majoritària de OCP a HA. No s'observa un canvi significatiu en quant a la quantitat de cèl·lules ni en la forma però si que podem veure una major adhesió d'elles en el medi.

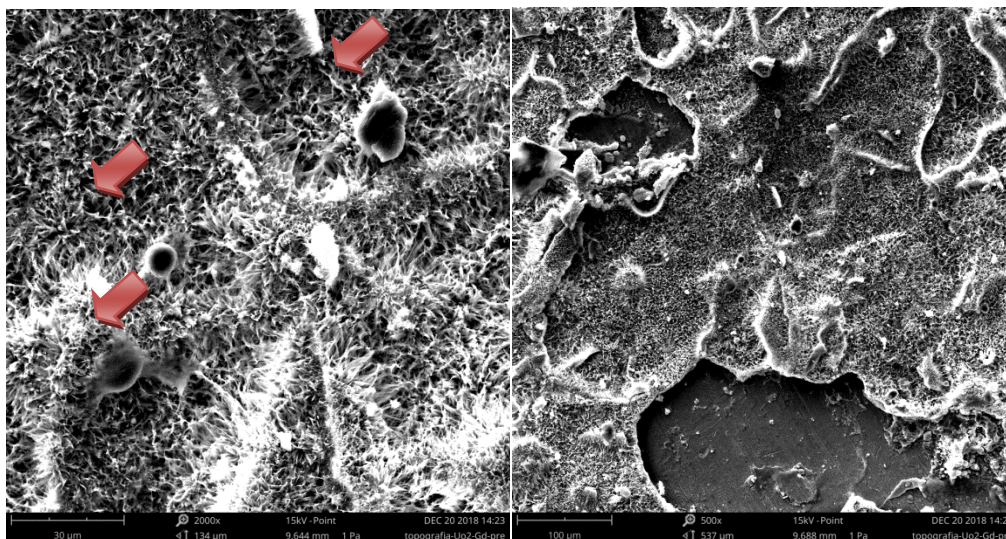
7-



Imatge 5.2.15. Fletxes roges marquen les cèl·lules sobre la superfície

Les cèl·lules en aquest cas també són poques, però podem veure que estan molt més integrades a la morfologia de la superfície que la seva homologa sense tractament d'autoclau. També s'ha de constatar que la superfície de la mostra sense tractament no té la forma que s'havia obtingut amb els experiments anteriors, amb les mateixes característiques, en canvi aquest si per tant és més representatiu.

8-



Imatge 5.2.16. Fletxes roges marquen les cèl·lules sobre la superfície

Si posem atenció a la imatge feta a 500 augments el primer que ens crida l'atenció són les nombroses zones sense capa ceràmica, això es degut a que la microestructura amorfa s'adhereix menys al titani que l'estructura de cintes o d'agulles i amb el tractament d'autoclau, és molt possible que certes zones s'hagin després. Això pot haver afectat a les cèl·lules, tot i que hi ha però menys que en altres casos.

5.1.4. Discussió sembrat cel·lular

Podem dir que la microestructura de la capa de CaP no és un factor determinant a la adhesió de cèl·lules a la superfície ja que totes tenen un comportament molt similar amb petites diferències. Podem concloure observant els resultats que durant les primeres 24 hores les cèl·lules aguanten perfectament sobre el CaP, però que al llarg de 72 hores ja tenen més problemes i el nombre

d'elles disminueix dràsticament. No passa el mateix amb el titani llis, ja que al principi no té una adhesió tan bona però amb el pas del temps no són tantes es cèl·lules que es desprenen de la seva superfície.

El nombre de cèl·lules per unitat d'àrea ha estat calculat amb les fotografies. Però aquests valors no són exactes ja que les cèl·lules es distribuïen de diferents maneres per la superfície de la mostra i sobretot en el cas de 24 hores que hi havia moltes cèl·lules, es feia difícil el seu recompte ja que estaven unes sobre les altres.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|-------------|---------|--------|---------|---------|----------|---------|---------|---------|
| 24 h | 33333'3 | 200000 | 66666'6 | 50000 | 116666'6 | 83333'3 | 130000 | 43333'3 |
| 72 h | 6666'6 | 20000 | 6666'6 | 13333'3 | 20000 | 33333'3 | 13333'3 | 20000 |

Taula 5.1.4. 1 Nombre aproximat de cèl·lules quantificades per mm²

Una possible explicació per el descens de el nombre de cèl·lules passades les 72 hores així com el canvi de forma, ja que cap de les formes de CaP trobades és perjudicial per l'esser humà, pot ser que la hidroxiapatita o part d'ella fos del tipus deficient en Calci. Aquesta fase agafa els ions de Calci del medi, el qual necessiten les cèl·lules per viure. Per això a les 24 hores les cèl·lules estaven en perfectes condicions ja que encara no s'havia consumit tot el Calci que contenia el medi cel·lular que havíem preparat. Aquest factor, no condiciona l'efectivitat d'aquestes capes per a recobriments de pròtesis de titani que tinguin que ser implantades en humans, ja que el Calci del medi intern s'aniria reposant per els propis processos fisiològics [20][21].

5.2. Difracció de raigs X

5.2.1. Resultats difracció de raigs X

En primer lloc és varen analitzar amb difracció de raigs X 4 mostres significatives de tots els experiments. A les quals podíem observar diferents microestructures.

| | 1 | 2 | 3 | 4 |
|--|---------|------|------|-----|
| Temperatura (°) | 80 | 60 | 80 | 80 |
| Temps (min) | 30 | 60 | 60 | 60 |
| pH | 8 | 4'5 | 4'5 | 4'5 |
| Concentració Ca | 0'05 M | 6'1 | 6'1 | 7'2 |
| Concentració P | 0'025 M | 3'6 | 3'6 | 3'6 |
| Rati Ca/P | 2 | 1'69 | 1'69 | 2 |
| Pre-tractament de la superfície | No | Si | Si | Si |

Taula 5.2.1 1 Condicions de les mostres enviades a raigs X

Amb aquest mètode de caracterització, volem saber en quina de les diferents fases estequiomètriques es troba el CaP adherit a la superfície del titani. Per saber-ho, compararem els valors dels pics del angles i els compararem amb un patró normal de hidroxiapatita pura.

Els codis dels patrons emprats són els següents:

- HA: 76-0694
- OCP: 79-0423
- DCPD: 09-0077
- DCPA: 09-0080

MOSTRA 1:

PICS

| Àngle (°) | Intensitat (nº de comptes) | Fase |
|-----------|----------------------------|------|
| 4'7 | 17547 | OCP |
| 9'44 | 1689 | OCP |
| 31'74 | 458 | OCPd |
| 33'58 | 378 | DCDP |

Taula 5.2.1 2 Taula amb els angles corresponents als pics més significatius juntament amb el seu valor de intensitat i la seva fase associada.

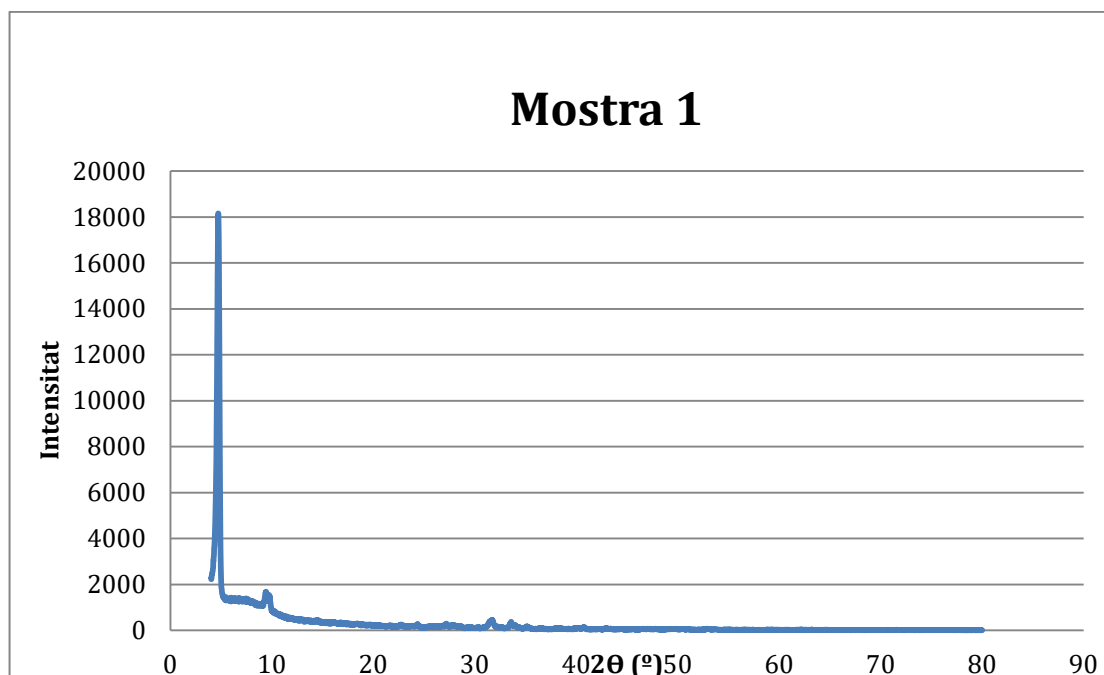


Figura 5.2. 1 Intensitat vs Angle

Com podem observar en aquesta mostra trobem pocs pics, i un molt més pronunciat que els altres que correspon a OCP. També s'observen altres pics que podrien indicar-nos que hi ha altres fases com DCPD. Els pocs pics que hi ha, en comparació amb altres resultats, segurament és donat per el gran valor d'intensitat que trobem en el primer pic que fa que els altres siguin difícilment reconeguts.

Per solucionar el problema de falta de visibilitat dels pics hem decidit eliminar el pic de l'angle de 4.7° , per tenir una visió més òptima de tots els valors.

| Àngle ($^\circ$) | Intensitat | Fase |
|--------------------|------------|------|
| 24'64 | 253 | OCP |
| 26'04 | 200 | OCP |
| 27'98 | 235 | OCP |
| 36'46 | 89 | OCP |
| 40'74 | 116 | DCPA |

Taula 5.2. 1 Taula amb els angles corresponents als pics més significatius juntament amb el seu valor de intensitat i la seva fase associada.

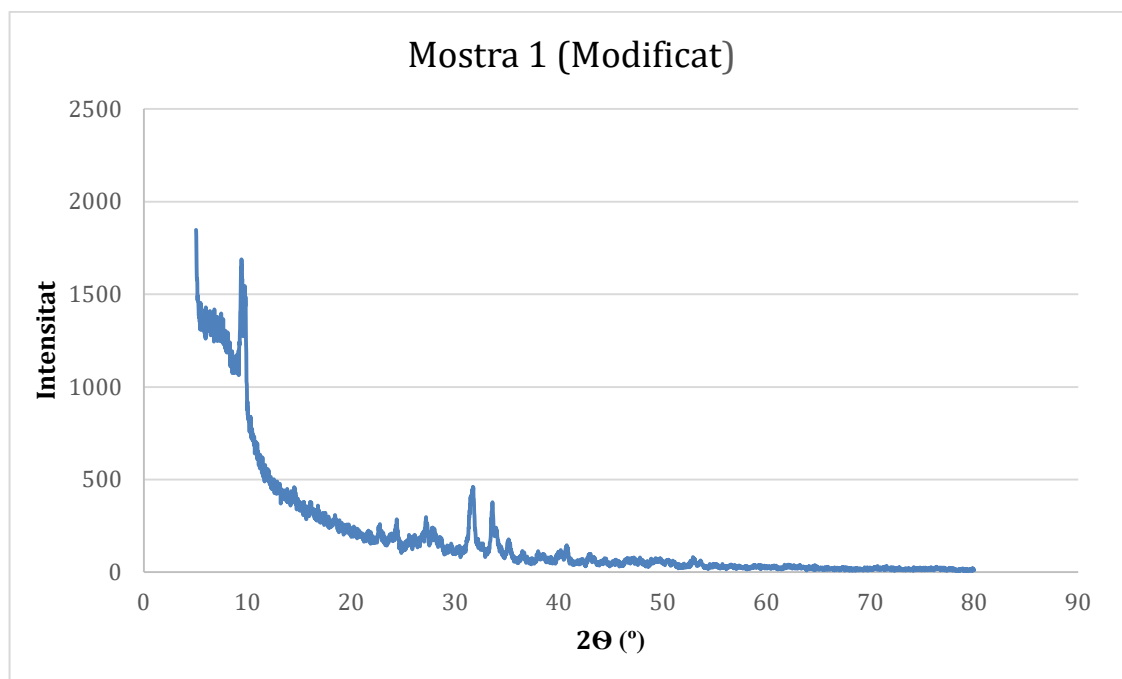


Figura 5.2. 2 Nova gràfica amb el pic de 4'7º eliminat

Els resultats obtinguts després del truncament de l'eix y, ens segueixen mostrant una majoria de pics corresponents a l'OCP més un de DCPA. El qual afegeix una estructura més a la composició dels cristalls de CaP.

MOSTRA 2:

PICS

| Àngle (°) | Intensitat | Fase |
|-----------|------------|------|
| 4'66 | 6863 | OCP |
| 9'36 | 2136 | OCP |
| 9'72 | 1976 | OCP |
| 22'54 | 323 | OCP |
| 24'12 | 360 | DCPA |
| 26'14 | 383 | OCP |
| 31'46 | 537 | DCPA |
| 33'62 | 283 | OCP |

| | | |
|-------|-----|------|
| 40'74 | 162 | DCPA |
|-------|-----|------|

Taula 5.2. 2 Taula amb els angles corresponents als pics més significatius juntament amb el seu valor de intensitat i la seva fase associada.

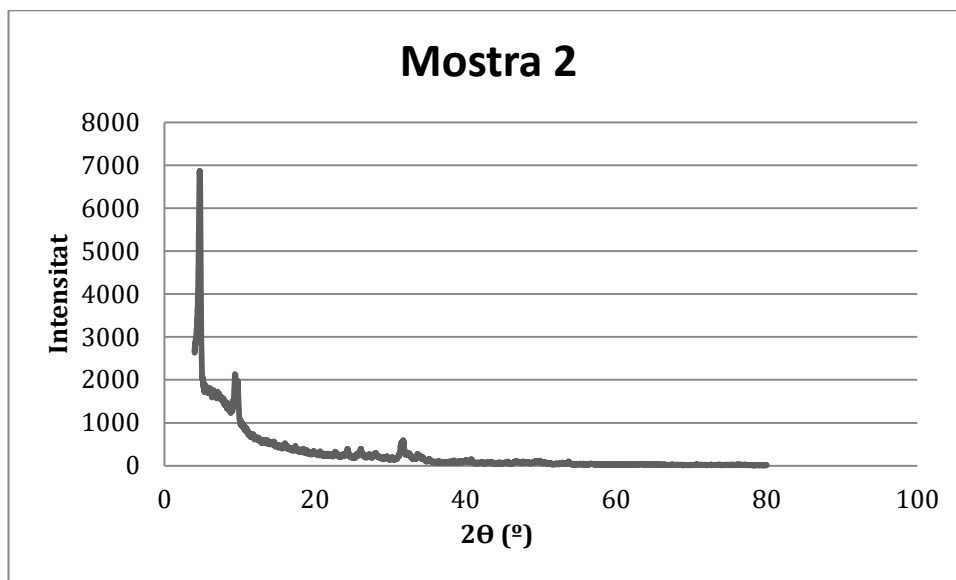


Figura 5.2. 3 Intensitat vs Angle

En aquest cas trobem un gràfic molt similar a l'anterior però on s'observen més pics, ja que el primer té un valor d'intensitat més reduït. Segueix predominant l'OCP tot i que veiem petits pics de DCPA. Senyal que en la capa de CaP és troben les dues fases tot i que la primera en major quantitat que l'altre.

MOSTRA 3:

PICS

| Àngle (°) | Intensitat | Fase |
|-----------|------------|----------|
| 4'7 | 7964 | OCP |
| 9'36 | 1589 | OCP |
| 16'06 | 839 | OCP |
| 19'76 | 492 | DCPA,OCP |
| 22'62 | 410 | OCP |
| 24'36 | 736 | OCP |
| 26'08 | 1517 | OCP |

| | | |
|-------|------|-----------|
| 28 | 543 | OCP |
| 29'24 | 487 | OCP, DCPD |
| 31'66 | 1236 | OCP |
| 33'54 | 694 | DCPD |
| 35'08 | 403 | OCP, DCPD |
| 38'42 | 365 | HA |
| 40'14 | 438 | DCPA |

Taula 5.2. 3 Taula amb els angles corresponents als pics més significatius juntament amb el seu valor de intensitat i la seva fase associada.

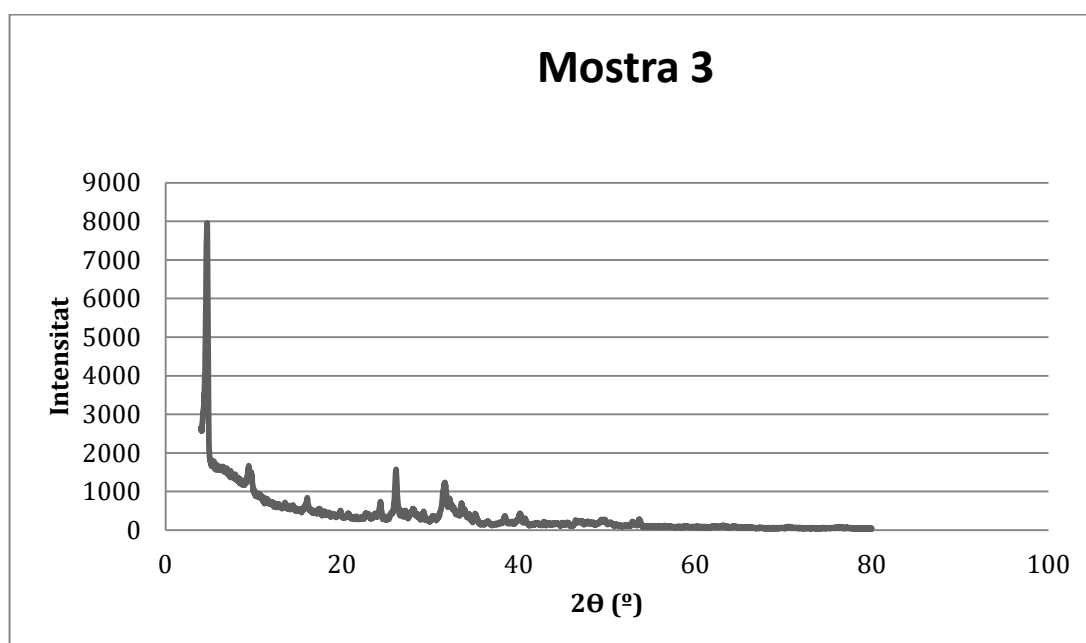


Figura 5.2. 4 Intensitat vs Angle

Com era d'esperar el resultats són similars als de la mostra 3, ja que els dos pertanyen a dues microestructures molt similars segons el que s'ha observat al SEM. Tot i això veiem petites aparicions de DCPD i HA que ens denoten que té una composició més variada on apareixen diferents fases. Tot i això segueix predominant l'OCP.

MOSTRA 4:**PICS**

| Àngle (°) | Intensitat | Fase |
|-----------|------------|----------|
| 4'68 | 4371 | OCP |
| 9'34 | 1368 | OCP |
| 13'65 | 716 | OCP |
| 16'06 | 1036 | OCP |
| 17'5 | 518 | OCP |
| 24'3 | 516 | OCP |
| 26'08 | 1885 | OCP |
| 28'12 | 331 | HA, OCP |
| 32'12 | 734 | HA |
| 40'16 | 406 | DCPA, HA |
| 49'74 | 239 | DCPA |
| 53'64 | 311 | DCPA |

Taula 5.2. 4 Taula amb els angles corresponents als pics més significatius juntament amb el seu valor de intensitat i la seva fase associada.

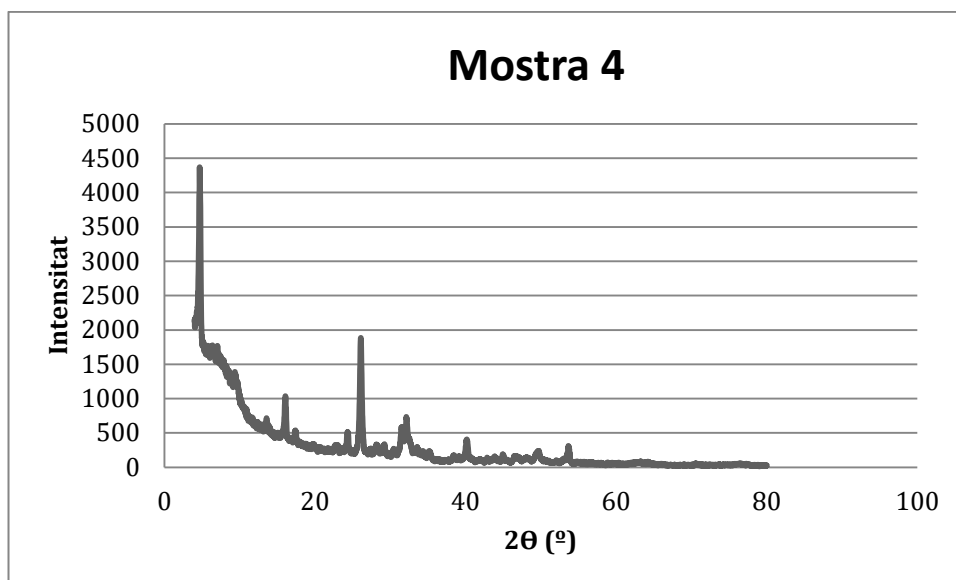


Figura 5.2. 5 Intensitat vs Angle

A la mostra 4 tenim un resultat molt similar als obtinguts a totes les mostres d'aquesta mesura amb raigs X. Veiem molts pics de OCP i alguns possibles de HA i DCPA.

DESPRÉS DE TRACTAMENT AMB PRESSIÓ I TEMPERATURA (134 °, 54 min, 2 bar)

Per intentar modificar la fase del CaP de les mostres analitzades amb DRX, varen ser tractades dins una autoclau a 134° durant 54 minuts a una pressió de 2 bar. Es va fer amb les mateixes mostres que s'havien analitzat amb raigs X anteriorment, més una de nova la qual tenia una l'estructura no cristal·lina.

MOSTRA 1:

PICS

| Àngle (°) | Intensitat | Fase |
|-----------|------------|------|
| 4'66 | 4862 | OCP |
| 10'92 | 1022 | HA |
| 28'9 | 321 | HA |
| 31'76 | 863 | HA |
| 32'84 | 727 | HA |
| 38'42 | 203 | HA |

| | | |
|-------|-----|------|
| 40'34 | 273 | DCPA |
| 46'66 | 143 | HA |

Taula 5.2. 5 Taula amb els angles corresponents als pics més significatius juntament amb el seu valor de intensitat i la seva fase associada.

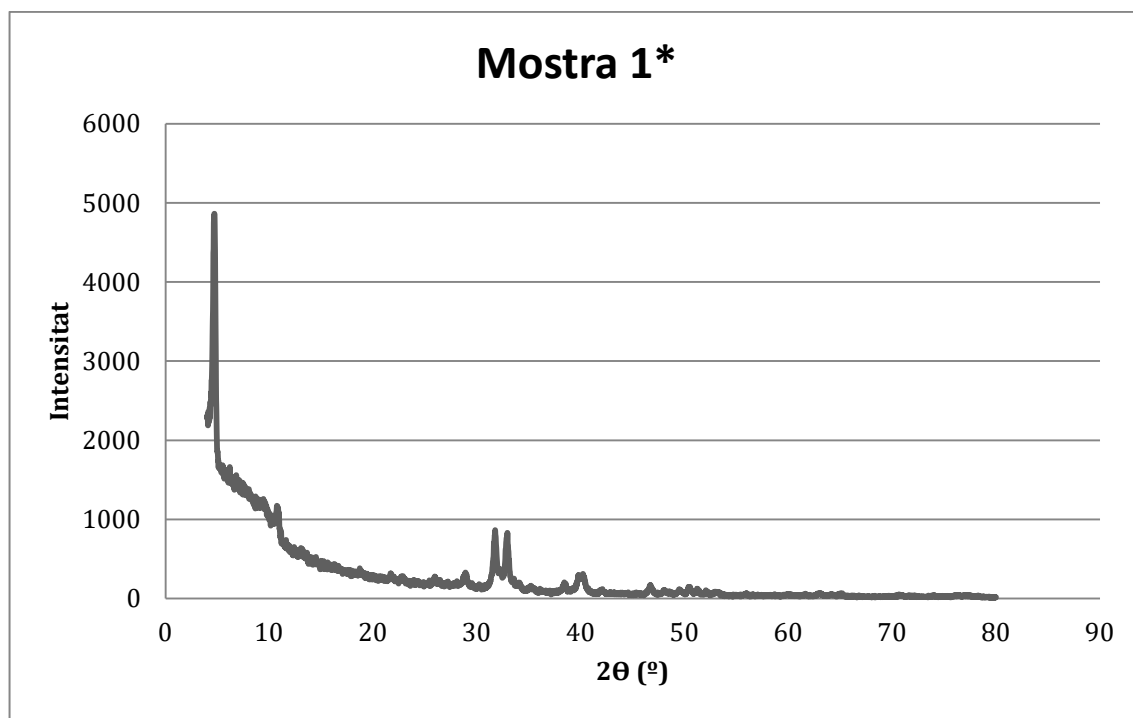


Figura 5.2. 6 Intensitat vs Angle

Es pot apreciar que alguna cosa ha canviat si ho comparem amb l'espectre de la mateixa mostra sense tractament d'autoclau. Si mirem els valors dels angles, la majoria corresponen a HA i alguns de DCPA i OCP (veiem que el pic que tenia tanta intensitat inicialment l'ha reduïda).

MOSTRA 2:

PICS

| Àngle (°) | Intensitat | Fase |
|-----------|------------|--------|
| 4'64 | 2368 | OCP |
| 10'76 | 1084 | HA |
| 14'76 | 566 | OCP... |
| 22'76 | 412 | HA |
| 25'94 | 1440 | HA |

| | | |
|-------|------|----------|
| 28'02 | 321 | OCP |
| 31'72 | 1494 | HA |
| 32'9 | 895 | DCPA, HA |
| 34'06 | 528 | HA, |
| 38'38 | 202 | HA |
| 39'64 | 281 | - |
| 43'86 | 156 | HA |
| 46'66 | 355 | HA |
| 48'16 | 202 | HA |
| 49'4 | 305 | HA |
| 53'3 | 261 | - |
| 64'22 | 136 | - |

Taula 5.2. 6 Taula amb els angles corresponents als pics més significatius juntament amb el seu valor de intensitat i la seva fase associada.

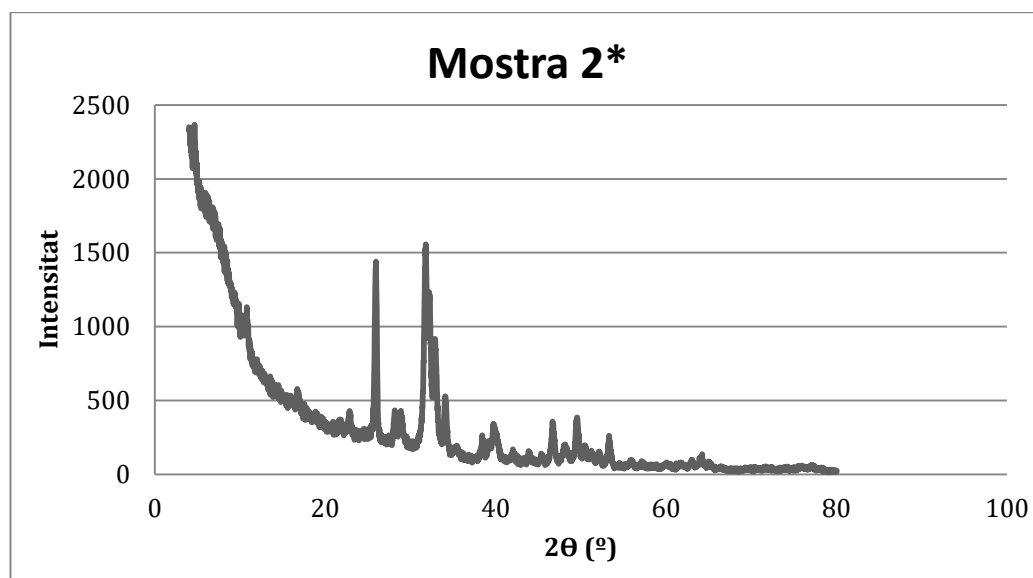


Figura 5.2. 7 Intensitat vs Angle

Aquesta mostra també ha sofert un canvi en la seva composició, si antes la majoria de pics corresponien al OCP, ara corresponen a HA. Alguns dels pics és sobre posen amb DCPA, per la

qual cosa podríem estar davant una capa amb les dos fases. Els valors en blanc, indiquen pics els quals no s'han pogut indexar segons les referències.

MOSTRA 3:

PICS

| Àngle (º) | Intensitat | Fase |
|------------------|-------------------|-------------|
| 4'12 | 2149 | - |
| 10'74 | 1216 | HA |
| 21'74 | 428 | HA |
| 22'66 | 389 | OCP |
| 25'92 | 689 | HA |
| 28'2 | 341 | OCP |
| 28'86 | 509 | HA |
| 31'78 | 1665 | , HA |
| 32'84 | 1273 | HA |
| 34'16 | 369 | DCPD |
| 35'1 | 204 | DCPD |
| 38'38 | 206 | HA |
| 39'84 | 464 | HA |
| 46'7 | 337 | DCPD, HA |
| 48'14 | 204 | DCPD |
| 49'54 | 267 | HA |
| 50'52 | 218 | HA |
| 51'16 | 186 | - |
| 53'26 | 123 | HA |

Taula 5.2. 7 Taula amb els angles corresponents als pics més significatius juntament amb el seu valor de intensitat i la seva fase associada.

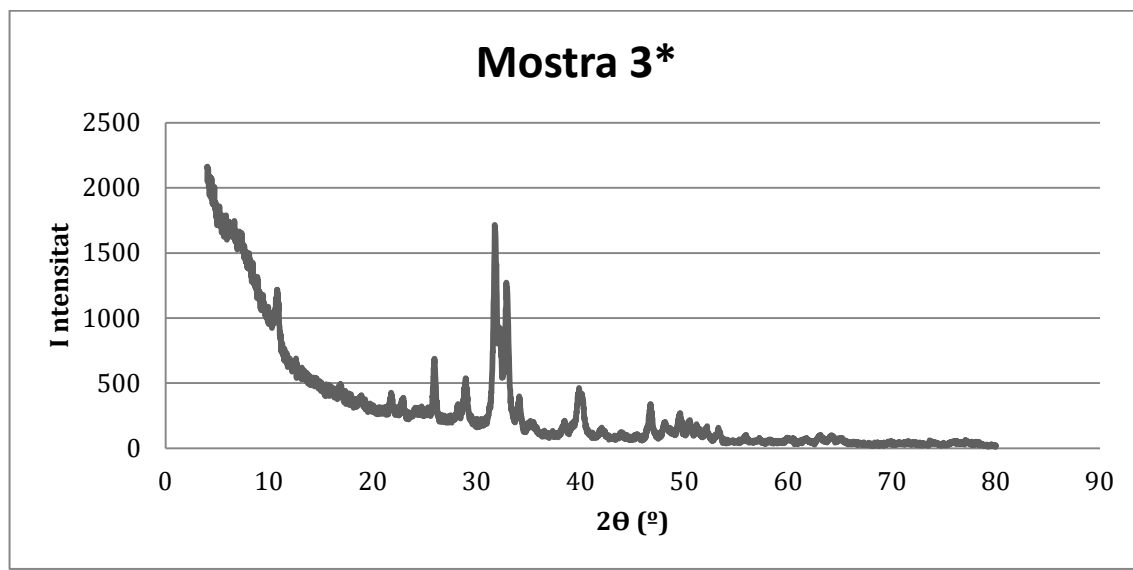


Figura 5.2. 8 Intensitat vs Angle

La capa d'aquesta mostra sembla ser molt variada. Tot i que tornem a tenir la HA molt present l'OCP no ha desaparegut del tot i tenim altres fases en menor concentració com DCPD. Per la qual cosa podem afirmar que aquest tractament definitivament canvia la fase de la capa de CaP.

MOSTRA 4:

PICS

| Àngle (°) | Intensitat | Fase |
|-----------|------------|------|
| 4'26 | 1919 | - |
| 10'86 | 894 | HA |
| 16'76 | 604 | HA |
| 22'92 | 430 | OCP |
| 25'92 | 3398 | HA |
| 28'14 | 730 | HA |

| | | |
|-------|------|------|
| 32'18 | 1963 | HA, |
| 32'96 | 569 | OCP |
| 34'06 | 827 | HA |
| 38'34 | 243 | HA |
| 40'1 | 555 | DCPA |
| 43'88 | 212 | HA |
| 46'7 | 395 | HA |
| 48'66 | 153 | HA |
| 49'52 | 624 | HA |
| 53'28 | 428 | HA |
| 64'22 | 135 | - |

Taula 5.2. 8 Taula amb els angles corresponents als pics més significatius juntament amb el seu valor de intensitat i la seva fase associada.

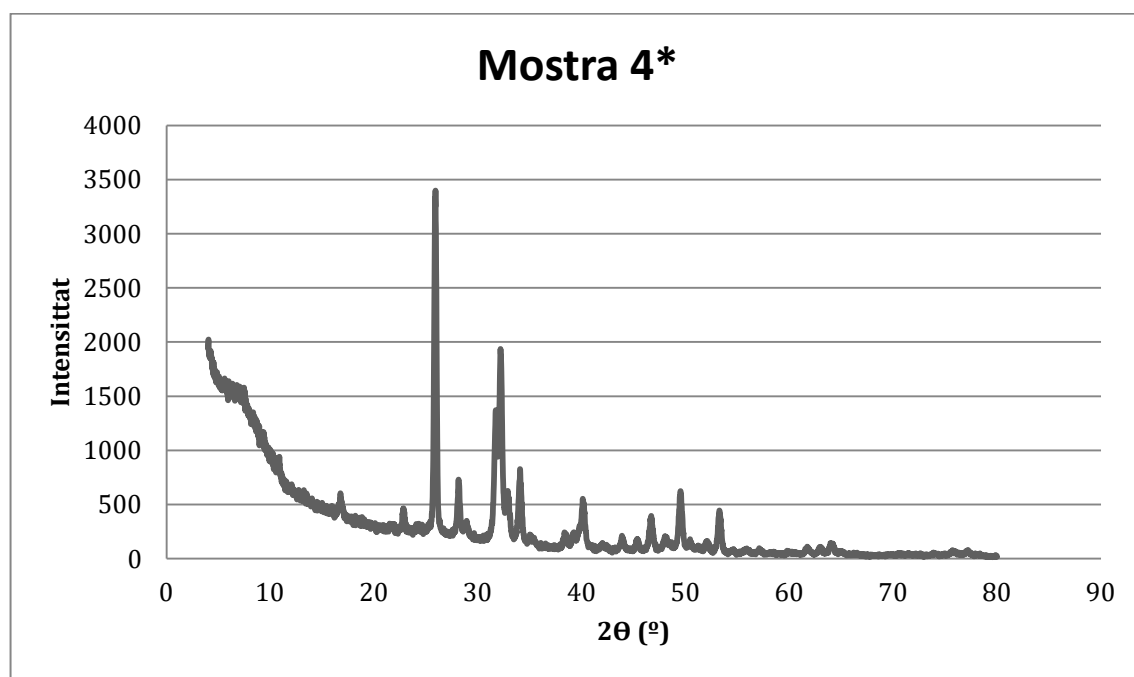


Figura 5.2. 9 Intensitat vs Angle

Trobem les mateixes fases que sense el tractament, OCP, HA, DCPA, però amb més concentració d'HA i menys d'OCP, mentre que les altres dos s'han mantingut en una menor quantitat.

MOSTRA 5:

PICS

| Àngle (°) | Intensitat | Fase |
|-----------|------------|----------|
| 16'82 | 613 | HA |
| 22'86 | 455 | HA, |
| 25'88 | 5739 | , HA |
| 28'1 | 872 | HA |
| 32'2 | 2366 | OCP, HA |
| 34'04 | 978 | HA |
| 38'34 | 482 | HA |
| 40'16 | 512 | DCPA |
| 44'02 | 221 | - |
| 45'5 | 191 | DCPA |
| 46'7 | 454 | HA, DCPD |
| 49'5 | 849 | HA |
| 53'24 | 678 | HA |
| 62'86 | 119 | - |
| 64'14 | 226 | HA |

Taula 5.2. 9 Taula amb els angles corresponents als pics més significatius juntament amb el seu valor de intensitat i la seva fase associada.

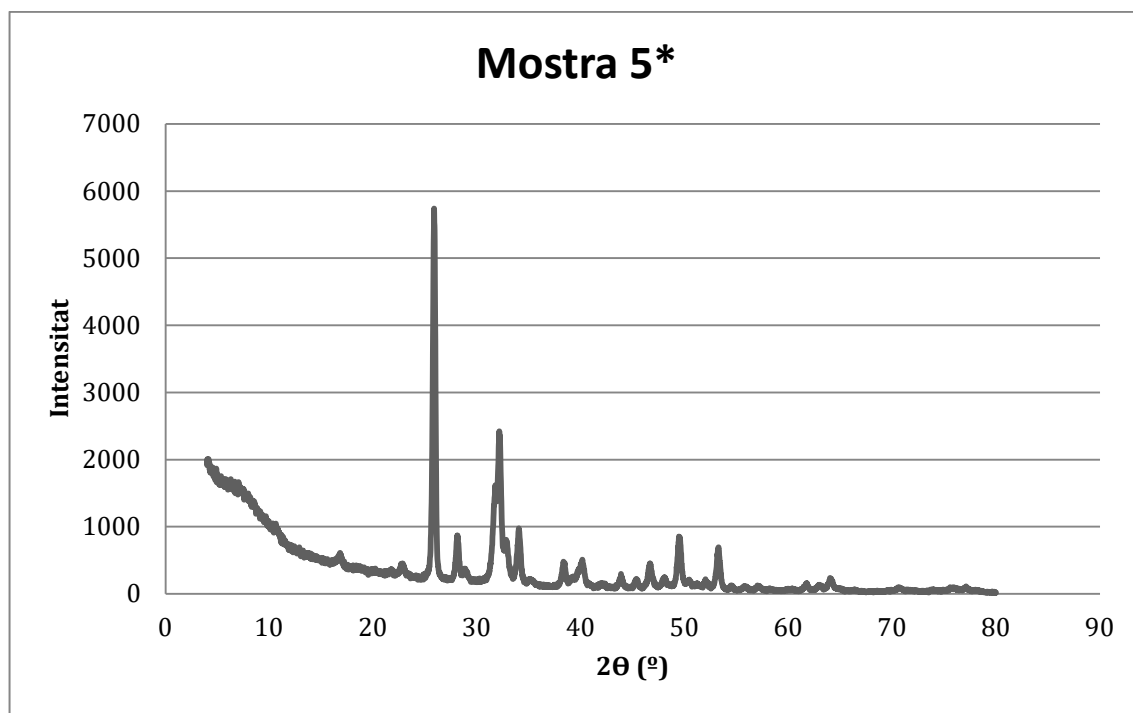


Figura 5.2. 10 Intensitat vs Angle

Per aquesta mostra no tenim comparativa sense tractat a pressió i temperatura per la qual cosa no podem saber si ha canviat de composició. Predomina l'HA com a totes les tractades i també hi ha abundants pics de DCPA i alguns superposats amb HA de DCPD. Podem dir que té una estructura variada a la qual hi trobem diferents fases.

5.2.2. Discussió difracció de raigs X

Els resultats no han estat els més esperats, ja que canviant les condicions d'estudi, així com el rati de Ca/P de les solucions, no s'ha trobat diversitat de fases. Tot i que hi ha pics esporàdics d'altres composicions, les mostres sense tractament presenten una majoria d'OCP. Però el factor més interessant que és per treure d'aquests experiments, és que podem canviar la composició de el CaP mitjançant el tractament de pressió i temperatura, la qual cosa té un gran valor per aplicacions. Ja que hem observat que amb l'electrodeposició és molt més fàcil obtenir OCP, i també sabem que la HA té més valor per aplicacions mèdiques, d'aquesta manera hem trobat un mètode amb el qual podem fabricar una capa d'HA a partir d'OCP.

5.3. Alliberament de Calci

5.3.1. Resultats alliberament de Calci

El primer que varem fer per poder mesurar els resultats d'alliberament de Calci, va ser crear una corba de calibratge amb una solució de Calci, per així poder relacionar els valors d'absorbància obtinguts posteriorment amb el lector de plaques de les nostres mostres. Per això es va fer un estudi dels valor d'absorbància de les següents condicions:

| Concentració Ca (mM) | Absorbància |
|----------------------|-------------|
| 10 | 2,472 |
| 8,333 | 2,216 |
| 5 | 1,884 |
| 2 | 0,98 |
| 1 | 0,367 |

Taula 5.3. 1 Relació entre les concentracions i l'absorbància de l'experiment control

Els valors de l'absorbància són la mitja dels 3 resultats obtinguts per cada una de les concentracions. Amb els resultats obtingut ajustarem la següent corba de calibratge per veure els valors normals d'absorbància del Calci per a una longitud d'ona de 570 nm.

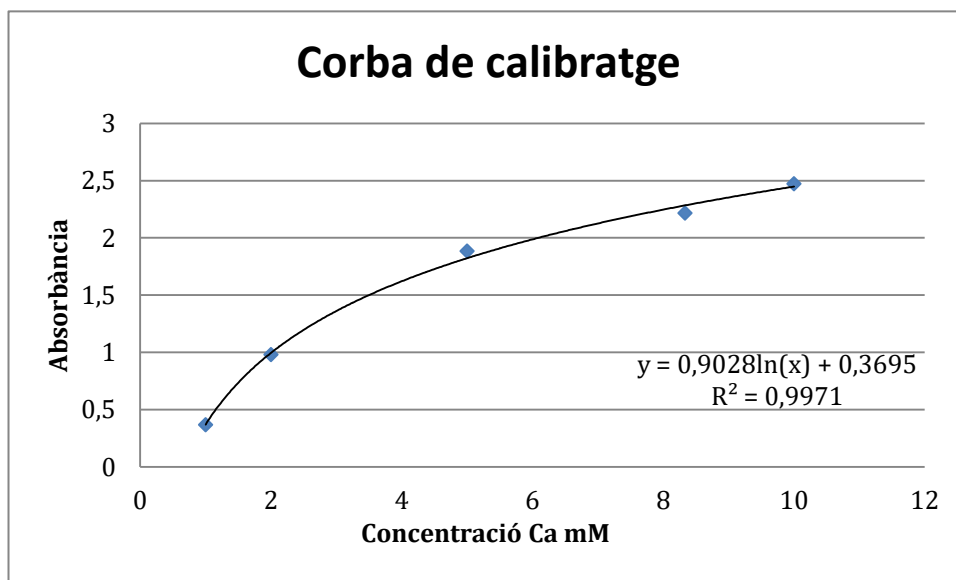


Figura 5.3. 1 Corba de calibratge amb l'equació de la recta (y) i el coeficient de regressió quadrat (R^2)

Amb les mostres amb les condicions de la Taula 4.4. 1, és va realitzar l'experiment explicat anteriorment en aquest projecte[30]. Els resultats obtinguts varen ser els següents:

| Temps(min) | 0 | 5 | 10 | 15 | 30 | 60 | 90 | 120 | 180 | 240 | 300 | 900 |
|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1 | 0,166 | 0,157 | 0,167 | 0,162 | 0,157 | 0,158 | 0,163 | 0,155 | 0,16 | 0,162 | 0,161 | 0,158 |
| 2 | 0,156 | 0,155 | 0,16 | 0,154 | 0,147 | 0,161 | 0,157 | 0,162 | 0,161 | 0,162 | 0,161 | 0,159 |
| 3 | 0,161 | 0,164 | 0,719 | 0,172 | 0,139 | 0,264 | 0,322 | 0,379 | 0,205 | 0,16 | 0,163 | 0,159 |
| 4 | 0,17 | 0,159 | 0,157 | 0,164 | 0,158 | 0,149 | 0,157 | 0,165 | 0,156 | 0,166 | 0,162 | 0,159 |
| 5 | 0,167 | 0,167 | 0,166 | 0,161 | 0,155 | 0,166 | 0,159 | 0,158 | 0,155 | 0,16 | 0,167 | 0,151 |
| 6 | 0,181 | 0,162 | 0,16 | 0,168 | 0,164 | 0,156 | 0,166 | 0,176 | 0,162 | 0,165 | 0,16 | 0,16 |
| 7 | 0,137 | 0,167 | 0,168 | 0,168 | 0,155 | 0,165 | 0,152 | 0,11 | 0,157 | 0,159 | 0,17 | 0,173 |
| 8 | 0,181 | 0,248 | 0,179 | 0,184 | 0,12 | 0,165 | 0,226 | 0,211 | 0,211 | 0,163 | 0,203 | 0,255 |

Taula 5.3. 2 Valors llegits per el lector de plaques per cada una de les mostres per cada període de temps

Els valors de la taula Taula 5.3. 1 representen els valors no acumulatius. Per una millor comprensió dels resultats cal mirar la Figura 5.3. 2 on es veu la corba acumulativa dels valors de l'absorbància dels ions de Ca^{2+} .

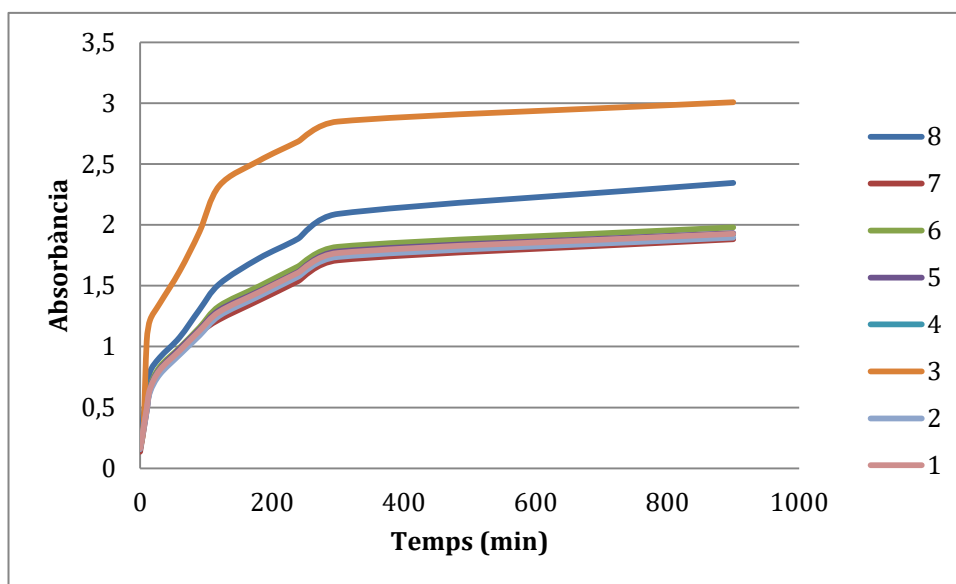


Figura 5.3. 2 Valors de l'absorbància per cada una de les mostres amb relació amb el temps.

5.3.2. Discussió alliberament de Calci

El primer que crida l'atenció si observem els resultats, és que les 2 mostres de Titani control sense capa, presenten uns valors d'absorbància, quan teòricament no presenten ions de Calci. Per això hem de suposar que el volum de reactiu usat tingués la seva pròpia absorbància, motiu per el qual

es va fer un ajust per així poder llegir uns possibles valors reals en el que fèiem una mitja amb les dades de les mostres 4 i 5 (Titani sense capa) les quals presentaven uns valors molt similars entre elles. Llavors aquests valor és restava a totes les altres mostres amb la finalitat d'obtenir un valor real de l'absorbància.

$$M = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n X_i$$

Equació 5.3.2.1 Equació de la mitja

$$S = \sqrt{\frac{\sum_i (X_i - M)^2}{n}}$$

Equació 5.3.2.2 Equació de la desviació estàndard

Obtinguent els valors de:

- $M = 0'160583$
- $S = 0'005477$

Amb un valor tan petit de desviació estàndard dona força a la nostra hipòtesis, ja que tot son valors molt similars entre ells. Així els nous valors obtinguts són els següents:

| T (min) | 0 | 5 | 10 | 15 | 30 | 60 | 90 | 120 | 180 | 240 | 300 | 900 |
|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1 | 0,005 | 0,005 | 0,012 | 0,013 | 0,013 | 0,013 | 0,016 | 0,016 | 0,016 | 0,017 | 0,017 | 0,017 |
| 2 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,001 | 0,001 | 0,003 | 0,003 | 0,003 |
| 3 | 0,000 | 0,004 | 0,562 | 0,574 | 0,574 | 0,677 | 0,839 | 1,057 | 1,101 | 1,101 | 1,104 | 1,104 |
| 4 | 0,009 | 0,009 | 0,009 | 0,013 | 0,013 | 0,013 | 0,013 | 0,017 | 0,017 | 0,023 | 0,024 | 0,024 |
| 5 | 0,006 | 0,013 | 0,018 | 0,018 | 0,018 | 0,024 | 0,024 | 0,024 | 0,024 | 0,024 | 0,030 | 0,030 |
| 6 | 0,020 | 0,022 | 0,022 | 0,029 | 0,033 | 0,033 | 0,038 | 0,054 | 0,055 | 0,059 | 0,059 | 0,059 |
| 7 | 0,000 | 0,006 | 0,014 | 0,021 | 0,021 | 0,026 | 0,026 | 0,026 | 0,026 | 0,026 | 0,035 | 0,048 |
| 8 | 0,020 | 0,108 | 0,126 | 0,150 | 0,150 | 0,154 | 0,220 | 0,270 | 0,320 | 0,323 | 0,365 | 0,460 |

Taula 5.3. 3 Valors acumulats desestimant la pròpia absorbància del reactiu

Els resultats obtinguts són els següents:

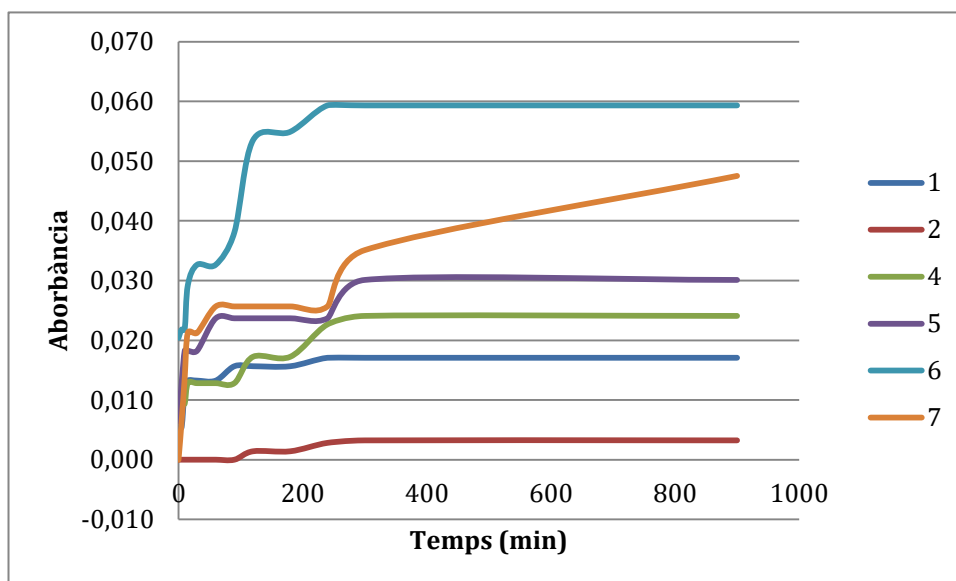


Figura 5.3. 3 Absorbància vs temps: mostres 1,2,4,5,6 i 7

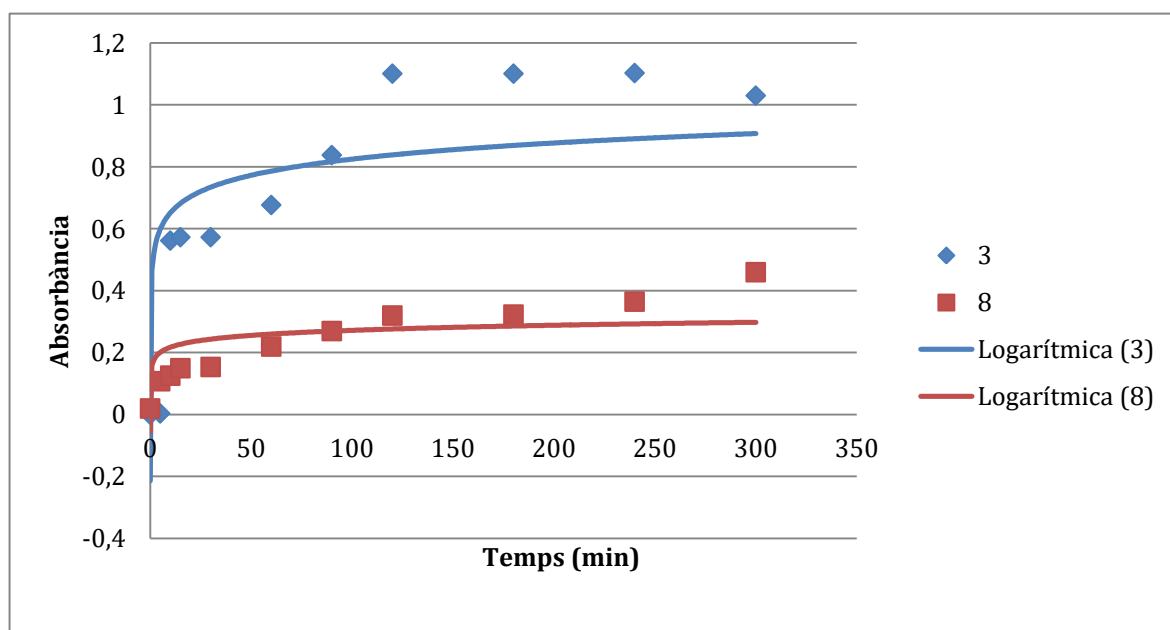


Figura 5.3. 4 Absorbància vs temps: mostres 3 i 8 amb línia de tendència logarítmica

Degut a uns valors molt més elevats que a la resta, en les mostres 3 i 8 s'han tingut que representar per separat, per poder observar els resultats amb claredat. Els valors d'absorbància negatius deguts a l'ajust anterior han estat estimats com a 0 per així tenir una funció més similar a la recta de calibratge.

A simple vista podem apreciar que les dues mostres que tenen un alliberament de ions de Calci considerable són les dues mostres que corresponen a una microestructura no cristal·lina. I que les

altres amb estructures cristal·lines s'han mantingut amb valors molt pròxims als de control, quasi negligibles.

Dins de les mostres amb microestructures cristal·lines podem descartar que les mostres 1 i 2 hagin tingut cap tipus d'alliberament ja que es troben per sota de les mostres de Titani pur. Però la 6 i la 7 sí que tenen un petit alliberament sobretot durant els primers instant de recompte, podem pensar que això és degut a que estan composades per HA, mentre que les altres dues ho estan principalment de OCP. Per aquest motiu podem suposar que en estructura cristal·lina el CaP allibera més Ca^{2+} en fase d'HA.

Segons els resultats també podem estimar que les formes amorfes de CaP alliberen més ions al medi, segurament perquè aquestes capes tenen un gruix superior a les cristal·lines.

Amb l'experiment control podem veure que la concentració de Ca^{2+} s'obté amb l'equació de la recta obtinguda. A continuació podem observar els valors obtinguts per les mostres 3 i 8 ja que són les úniques amb valors representatius.

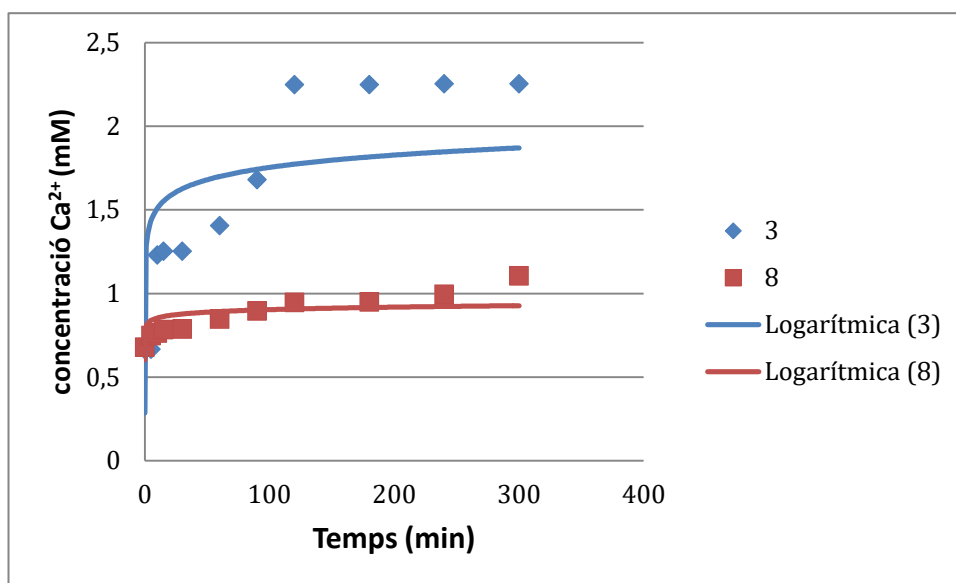


Figura 5.3. 5 Valors de la concentració de Calci expulsat per les mostres 3 i 8

5.4. Assaig de tracció

5.4.1. Resultats assaig de tracció

Les mostres que han estat sotmeses a assaig de tracció són les de la Taula 4.4. 1 menys la 4 i la 5 ja que són de Titani sense capa i el valor de resistència a tracció de l'adhesiu epoxi ja s'havia mesurat previament en 41 ± 3 MPa [10]. El valor de la Força a la qual es separa la capa ve donat per el mateix software de la màquina d'assaig amb el qual per poder calcular la Pressió que soporta tenim que aplicar la següent expressió:

$$Pressió = \frac{Força}{Àrea}$$

Equació 5.4.1.1

On l'àrea d'una circumferència es calcula com:

$$Àrea = \pi * R^2$$

Equació 5.4.1.2 Àrea de una circumferència

| Mostra | Força (N) | Cara per la que ha romput | Diàmetre adhesiu(mm) | Tensió |
|--------|-----------|---------------------------|----------------------|-----------|
| 1 | 219'1 | Superior | 9'3 | 3'22 MPa |
| 2 | 0'2 | Inferior | 5'2 | 9'41 kPa |
| 3 | 439'5 | Inferior | 9'2 | 6'61 MPa |
| 6 | 25'2 | Inferior | 5 | 1'28 MPa |
| 7 | 296'1 | Superior | 9 | 4'65 MPa |
| 8 | 911'6 | Inferior | 9'5 | 12'86 MPa |

Taula 5.4.1. 1 Valors Obtinguts amb l'assaig de tracció

5.4.2. Discussió assaig de tracció

Depenent de per quina cara s'hagi separat l'epoxi de la mostra, estarem parlant d'una força mínima o una força màxima. Si l'epoxi es separa per la cara de dalt, que era la cara amb la capa d'electrodeposició, tindrem el valor de tensió que pot suportar aquella capa sense separar-se del Titani.

Si la mostra s'ha separat per la cara inferior, el valor obtingut serà el valor mínim de força que pot aguantar sense separar-se.

En quant als valors màxims de tensió, veiem que són de 3'22 i 4'65 MPa. Les dues són mostres amb capa cristal·lina, però la 7 ha estat electrodepositada a major temperatura que la 1 i ha estat tractada a pressió, per la qual cosa podem suposar que aquestes condicions ajuden a tenir una capa més resistent.

Amb el valor de força mínims tenim una major varietat, ens crida l'atenció la mostra 2 que té un valor molt baix, ja que és va separar per el popi pes del suport, això podria ser donat per una baixa adherència de la capa, cosa que és poc probable, ja que la seva homòloga però amb tractament de pressió va suportar una pressió màxima de 4'65 MPa. Segurament estigui donat per una mala praxis, ja que s'hauria d'haver dissenyat un model amb varies repeticions per cada cas per poder tenir uns resultats més contundents. Després la mostra 6 amb el curat va quedar molt subjectada a la base i també pot ésser una dels motius d'una força menor que les altres. El que si veiem és que les fases amorfes tenen una resistència superior, sobretot amb el tractament (8), per la qual cosa podem treure la conclusió que les capes amorfes tenen una major adherència a la superfície del Titani que les cristal·lines. A més que amb el tractament a pressió i temperatura és pot incrementar aquest valor. De totes maneres els valors 2,3,6 i 8 són valors mínims de força, lo que suposa que podran aguantar més càrrega.

6. Conclusions

Amb aquest estudi, s'ha arribat a les següents conclusions:

- S'ha generat una metodologia per a la electrodeposició de CaP, amb el que és té un ventall de resultats, els quals poden ser molt útils per aplicacions posteriors. Arribant a la conclusió de que un dels factors clau, per obtenir una capa correcta de CaP mitjançant electrodeposició, la concentració de la solució és clau, ja que s'ha de ajustar a un punt òptim en el qual sigui suficient però no saturi la solució. La temperatura també condiciona la capa, observant que al augmentar-la obteníem una estructura més robusta.
- Amb la electrodeposició hem obtingut diferents tipus de CaP, però l'OCP ha estat la principal fase detectada. El gran descobriment ha estat que al aplicar un tractament de pressió i temperatura podíem canviar la fase i obtenir una capa formada majoritàriament per HA, que té un gran valor per aplicacions mèdiques.
- En quan a l'estudi de les cèl·lules sobre la superfície ceràmica, per avaluar la seva compatibilitat amb les possibles cèl·lules òssies en una implantació d'una pròtesis amb recobriment de CaP, hem vist que a les 24 hores les cèl·lules es trobaven en el seu estat natural, estirades formant una capa i enllaçades entre elles. Al llarg de les 72 hores el

nombre ha disminuït considerablement i han deixat de tenir la seva forma allargada per adoptar una més arrodonida. Una possible explicació per això, ja que els diferents tipus de CaP que s'han trobat a les mostres amb la difracció de Raigs X no són tòxiques per a l'ésser humà, és que la hidroxiapatita o part d'ella fos del tipus deficient en Calci. Aquesta fase agafa els ions de Calci del medi, el qual necessiten les cèl·lules per viure. Per això a les 24 hores les cèl·lules estaven en perfectes condicions ja que encara no s'havia consumit tot el Calci que contenia el medi cel·lular que havíem preparat. Aquest factor, no condiciona l'efectivitat d'aquestes capes per a recobriments de pròtesis de titani que tinguin que ser implantades en humans, ja que el Calci del medi intern s'aniria reposant per els propis processos fisiològics. Si aquesta afirmació fos certa, a les primeres 24 hores quan encara tenien Calci del medi les cèl·lules es trobaven en perfectes condicions, per la qual cosa podem afirmar que es tracta d'una capa no tòxica i que permet la vida de les cèl·lules per la qual cosa podria ser implantable i tenir una bona biocompatibilitat.

- Els resultats de l'estudi d'alliberament de ions de Ca^{2+} ens indiquen que les capes amb una estructura cristal·lina no tenen quasi alliberament, ja que els seus valors es troben al voltant de les dues mostres sense recobriment. En canvi les dues peces amb capa amorfa si que presenten un alliberament sobretot la capa amb més presència d'hidroxiapatita. Per tant aquests resultats també poden ajudar en estudis futurs ja que, depenent de si es desitja alliberament o no, és podrà optar per una morfologia o una altra.
- Amb l'assaig de tracció, tot i que els resultats no són del tot concloents ja que hi ha hagut problemes amb l'adhesió de dues peces, podem extreure que les capes amb estructura cristal·lina aguanten uns valors de pressió al voltant de 3'62 a 4'65 MPa. I les capes amb estructura amorfa de 6'61 a 12'86 MPa, també hem aconseguit crear una capa més resistent amb el tractament de l'autoclau. Aquestes dades també tenen un valor per a futures aplicacions de les pròtesis, perquè depenent de l'adhesió que es desitgi, és podrà optar per una forma o una altra

7. Costs econòmics i mediambientals

7.1. Costs econòmics

| Material | Quantitat | Preu | Cost |
|--|------------|----------------|---------|
| Barra de Titani (1m de longitud x 10 mm de diàmetre) | 0'1 metres | 368,45 €/barra | 36'85 € |
| Total | | | 36'85 € |

Taula 7.1. 1 Costs associats a la preparació de mostres

| Material | Quantitat | Preu | Cost |
|--------------------------------|-------------|----------------|-------|
| Embutidora LaboPress | 3 hores | 10 €/hora | 30 € |
| Polidora automàtica Buehler | 6 h | 30 €/hora | 180 € |
| Pany de carbur de silici P600 | 4 unitats | 1'50 €/unitat | 6 € |
| Pany de carbur de silici P1200 | 4 unitats | 1'50 €/unitat | 6 € |
| Pany de carbur de silici P2500 | 4 unitats | 1'50 €/unitat | 6 € |
| Pany de vellut | 2 unitats | 20 €/unitat | 40 € |
| Alúmina 1 µm | ½ recipient | 60 e/recipient | 30 € |
| Total | | | 298 € |

Taula 7.1. 2 Costs associats a la preparació de mostres

| Material | Quantitat | Preu | Cost |
|--------------|-----------|----------------|-----------|
| SEM | 10 h | 130 €/h | 1300 € |
| DRX | 9 mostres | 72'84 €/mostra | 655'56 € |
| Total | | | 1955'56 € |

Taula 7.1. 3 Costs associats a la caracterització

| Material | Quantitat | Preu | Cost |
|-----------------------------|-----------|------------|--------|
| Nitrat de calci tetrahidrat | 30 g | 7'76 €/kg | 0'23 € |
| Fosfat monoamònic | 0'020 kg | 42 €/kg | 0'84 € |
| Hidròxid sòdic en perles | 0'020 kg | 26'50 €/kg | 0'53 € |
| Total | | | 1'60 € |

Taula 7.1. 4 Costs associats a la electrodeposició



| Material | Quantitat | Preu | Cost |
|---------------------------|-----------|-------------|----------------|
| Medi McCoy | 0'1 L | 44'80 €/L | 4'48 € |
| FBS | 10 mL | 88,40 €/L | 0'88 € |
| HEPES | 2 mL | 1104'50 €/L | 2'21 € |
| L-glutamina | 1 mL | 125 €/L | 0'125 € |
| Penicilina/estreptomicina | 1 mL | 125 €/L | 0'125 € |
| Tripsina | 5 mL | 69'28 €/L | 0'35 € |
| Campana de cultius | 3 h | 20 €/h | 60 € |
| Total | | | 68'17 € |

Taula 7.1. 5 Costs associats al sembrat cel·lular

| Material | Quantitat | Preu | Cost |
|--------------------------------|-----------|-----------|----------------|
| Material general de laboratori | | | 1000 € |
| Enginyer júnior | 400 hores | 15 €/hora | 6000€ |
| Enginyer sènior | 150 hores | 35 €/hora | 5250 € |
| Recerca bibliogràfica | 40 hores | 15 €/hora | 600 € |
| Anàlisi de resultats | 40 hores | 15 €/hora | 600 € |
| Elaboració de memòria | 200 hores | 15 €/hora | 3000 € |
| Total | | | 16450 € |

Taula 7.1. 6 Altres Costs

| Material | Cost |
|---------------------------|-------------------|
| Materia prima | 36'85 € |
| Preparació de mostres | 298 € |
| Caracterització | 1955'56 € |
| Electrodeposició | 1'60 € |
| Sembrat cel·lular | 68'17 € |
| Altres costs | 16450 € |
| Subtotal | 18810'18 € |
| I.V.A (21%) | 3950'14 € |
| Total I.V.A inclòs | 22760'32 € |

7.2. Costs mediambientals

Aquest projecte s'ha realitzat minimitzant amb la mesura del possible l'impacte ambiental.

El fosfat de calci, no presenta cap problema a nivell mediambiental degut a la seva naturalesa. El laboratori té una gestió pròpia dels residus on tots els compostos formats per CaP s'aboquen a una garrafa de polipropilè per un posterior tractament.

Els residus sòlids que no han estat en contacte amb ninguna substància perillosa, es dipositen al contenidors de brossa que hi ha al laboratori, on es separen entre plàstic, paper i vidre.

Els residus sòlids no perillosos però que han estat en contacte amb productes biològics com podrien ser pipetes, puntes, falcons..., i que es troben en les campanes de cultius, tant cel·lulars com bacterians, són dipositats a un contenidor de brossa específic. Un cop el cubell està ple, aquesta brossa s'esterilitza mitjançant una autoclau.

Finalment, els productes sòlids i perillosos un cop utilitzats, són dipositats a un cubell especial que es troba a dins la campana per al seu processat.

8. Bibliografia

1. Souto, R.M., Laz, M. i Reis, R.L. Degradation characteristics of hydroxyapatite coatings on orthopaedic TiAlV in simulated physiological media investigated by electrochemical impedance spectroscopy. A.: 2003, Vol. 24, p. 4213-4221. DOI 10.1016/S0142-9612(03)00362-4.
2. Estupiñan, H. A., Metalúrgico, I., & Ph, D. (2007). Obtención de recubrimientos de fosfato de càlci sobre Ti6Al4V mediante espectroscopía de impedancia electroquímica Electrochemical Evaluation of Calcium Phosphate coatings on TiAl4V by Electrochemical Impedance, *10*(36), 255–260.
3. Eliaz, N., & Metoki, N. (2017). Calcium phosphate bioceramics: A review of their history, structure, properties, coating technologies and biomedical applications. *Materials*, *10*(4). <https://doi.org/10.3390/ma10040334>
4. Obtaining of calcium phosphate coatings on Ti₆Al₄V ELI by cathodic electrodeposition. (2007), (36), 209–213.
5. La, E.N., Del, C. i Ose, T. Los materiales de fosfato de calcio en la cirugía del tejido óseo. A: . 1974, 293-300
6. Ravaglioli, N., Krajewski, A. Bioceramics: Materials, Properties and Aplications (1992). Springer-Sience+Business media, B.V, USA
7. Jeong KI, Kim SG, Moon SY, Oh JS, Jo JH, Lim HS, Kim JS, Lim SC, Jeong MA. (2012). Experimental Study of Osseointegration and Stability of Intentionally Exposed Hydroxyapatite Coating Implants.

8. JUNQUEIRA, Carlos L; Carneiro J. Foltin, Janet. *Basic Histology, Text & Atlas*. 10a ed.. McGraw-Hill Companies, 2003, p. 144.
9. Ban, S., & Maruno, S. (1995). ' Effect of temperature on electrochemical deposition of calcium phosphate coatings in a simulated body fluid, *16*(13), 977–981
10. Vidal E, Buxadera-Palomero J, Pierre C, Manero JM, Ginebra MP, Cazalbou S, Combes C, Rupérez E, I Rodríguez D. Single-step pulsed electrodeposition of calcium phosphate coatings on titanium for drug delivery. *Surface & Coatings Technology* 358 (2019) 266–275.
11. Search, H., Journals, C., Contact, A., Iopscience, M., & Address, I. P. (n.d.). Deposition of Calcium Phosphate on Titanium by Electrochemical Process in Simulated Body Fluid, 1577.
12. Born, R., Scharnweber, D., Dard, M., & Worch, H. (2002). Electrochemically assisted deposition of thin calcium phosphate coatings at near-physiological pH.
13. Ban, S., & Maruno, S. (1998). Morphology and microstructure of electrochemically deposited calcium phosphates in a modified simulated body fluid, *19*, 1245–1253.
14. Robert, M. L., Larqu, A., & Ciapara, I. H. (2010). *CICY:treinta años de labor científica y educativa*.
15. Eliaz, N., Eliyahu M. (2005). Electrochemical processes of nucleation and growth of hydroxyapatite on titanium supported by real-time electrochemical atomic force microscopy.
16. Mekmene, O., Quillard, S., Rouillon, T., Bouler, J.-M., Piot, M., & Gaucheron, F. (2009). Effects of pH and Ca/P molar ratio on the quantity and crystalline structure of calcium phosphates obtained from aqueous solutions. *Dairy Science and Technology*, 89(3–4), 301–316. <https://doi.org/10.1051/dst/2009019>

17. Park, Y., Kim, S. H., Matalon, S., Wang, N. H. L., & Franses, E. I. (2009). Effect of phosphate salts concentrations, supporting electrolytes, and calcium phosphate salt precipitation on the pH of phosphate buffer solutions. *Fluid Phase Equilibria*, 278(1–2), 76–84.
<https://doi.org/10.1016/j.fluid.2009.01.005>
18. Chow, L. C. (2001). Solubility of Calcium Phosphates. *Octacalcium Phosphate, I*, 94–111.
<https://doi.org/10.1159/000061650>
19. Aguirre, N. O., & Olaya, J. J. (2013). Estado del arte en biocompatibilidad de recubrimientos
Biocompatibility of coatings : survey paper Resumen, 160–177.
20. Barba, A. et al. Osteoinduction by Foamed and 3D-Printed Calcium Phosphate Scaffolds : Effect of Nanostructure and Pore Architecture. A: . 2017, DOI 10.1021/acsami.7b14175.
21. Sadowska, J. i Sc, M. Biomimetic versus Sintered Calcium Phosphates : The in vitro Behavior of Osteoblasts and Mesenchymal Stem Cells. A: .
22. Rodríguez, DI. Implants Biomèdics. Tema 4; Blomaterials
23. Rahaman, M.N. et al. Acta Biomaterialia Bioactive glass in tissue engineering. A: *Acta Biomaterialia* [en línia]. Acta Materialia Inc., 2011, Vol. 7, núm. 6, p. 2355-2373. ISSN 1742-7061. DOI 10.1016/j.actbio.2011.03.016. Disponible a:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2011.03.016>.



